



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

BIANCA CRISTINE FAVERO

**Efeitos da leucina sobre a via da mTOR e da miostatina em
cultura celular de miotúbulos**

CAMPINAS

2017

BIANCA CRISTINE FAVERO

Efeitos da leucina sobre a via da mTOR e da miostatina em cultura celular de miotúbulos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA BIANCA CRISTINE
FAVERO E ORIENTADA PELA MARIA CRISTINA
CINTRA GOMES MARCONDES

Orientador: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F278e Favero, Bianca Cristine, 1990-
Efeitos da leucina sobre a via da mTOR e da miostatina em cultura celular de miotúbulos / Bianca Cristine Favero. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Leucina. 2. Metabolismo. 3. Fibras musculares esqueléticas. 4. Proteínas. I. Gomes-Marcondes, Maria Cristina Cintra, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of leucine on the mTOR and myostatin signaling pathway in myotubes cell culture

Palavras-chave em inglês:

Leucine

Metabolism

Muscle fibers, Skeletal

Proteins

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes [Orientador]

José Barreto Campello Carvalheira

Dora Maria Grassi Kassisse

Data de defesa: 15-03-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 15 de março de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a). Maria Cristina Cintra Gomes
Marcondes

Prof.(a). Dr.(a) José Barreto Campello
Carvalheira

Prof.(a) Dr(a). Dora Maria Grassi Kassisse

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTO

Agradeço, aos meus pais, por me auxiliar nos estudos e me incentivar a seguir carreira acadêmica.

Agradeço a Professora Maria Cristina por me receber com muito carinho em seu laboratório.

Agradeço aos colegas de laboratório em especial ao André pelas ajudas e discussões, ao Marcos pelos chocolates e a Laís pela confiança e apoio.

Agradeço aos meus amigos de curso, que me acompanharam nessa jornada desde 2010, que sempre estiveram presente e participaram ativamente de todo o processo.

Agradeço aos amigos do ETAPA, que me acompanharam tanto na preparação para o ingresso ao mestrado quanto na reta final da dissertação.

Agradeço, principalmente, ao meu noivo e melhor amigo, Celso, que sempre me incentivou e nunca me deixou desistir. Agradeço por aceitar meus atrasos, por me acompanhar nos finais de semana e feriados no laboratório e por estar sempre de ouvidos abertos às minhas reclamações.

Agradeço também a Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

Muitas doenças levam a um desequilíbrio no metabolismo energético, forçando o organismo a mobilizar as reservas energéticas a fim de suprir as necessidades do indivíduo. A caquexia é uma síndrome que acomete grande parte dos pacientes com câncer. Na caquexia há intensa espoliação de tecido adiposo e muscular. O tumor induz a secreção de muitos fatores que interferem no metabolismo proteico. A proteína chave desse metabolismo é a mTOR, que controla além da síntese de proteína, outros eventos celulares, como por exemplo, proliferação e diferenciação celular. Por outro lado, a leucina, por ser um aminoácido de cadeia ramificada com ação sinalizadora vem sendo estudada extensamente por alterar o metabolismo proteico, tanto por meio do aumento na síntese de proteína quanto na diminuição da degradação de proteína. Dessa maneira, o objetivo principal desse estudo foi elucidar as principais vias afetadas pela inibição da mTOR e como essas vias podem ser moduladas pela suplementação com leucina. Para tal, utilizamos células de mioblastos – C₂C₁₂ – diferenciadas em miotúbulos que foram tratadas com rapamicina a fim de inibir a atividade de mTOR, e depois foram suplementadas com leucina para avaliação das vias moduladas pelo aminoácido e possível dependência da mTOR para seus efeitos. A leucina foi capaz de estimular p70S6K em células C₂C₁₂ tratadas com rapamicina, demonstrando que possivelmente há uma via paralela pela qual a leucina pode vir a atuar na síntese de proteína. A leucina também foi capaz de diminuir tanto ativação de Smad2 quanto de FoxO3a nas células C₂C₁₂ tratadas com rapamicina, demonstrando que a leucina atuou possivelmente como efeito sinérgico à rapamicina na inibição da proteólise. Além disso, a leucina demonstrou aumentar o consumo de oxigênio independente da presença da mTOR, assim como, aumentou a atividade da catepsina B nesses miotúbulos C₂C₁₂. Esses resultados mostraram que além de modular o metabolismo proteico, a leucina foi capaz de modular vias de obtenção de energia e que esse efeito não dependeu diretamente da ativação da mTOR. Para o futuro, ainda são necessários experimentos que indiquem qual ou quais possíveis alvos desse aminoácido e em qual situação esse alvos são ativados em miotúbulos. Assim teremos melhor conhecimento de como a suplementação com leucina pode auxiliar no ganho de massa magra em pacientes cujo tecido muscular esquelético esteja sendo depletado.

ABSTRACT

Several diseases lead to an unbalance in the metabolic processes, forcing the organism to deplete the body's energetic reserve to supply its own needs. Most of these diseases lead to cachexia syndrome, which is present in many patients with cancer. In cachexia, there is an excessive host waste of both adipose and muscle tissues. The tumour mass growing induces the release of many factors which primarily affect the protein metabolism. In this metabolism, the main key protein is mTOR which besides controlling protein synthesis, controls many other events, such as proliferation and cellular differentiation. Thus, the main focus of the present study was reporting the pathways that were affected by mTOR inhibition and how leucine supplementation could modulate these pathways. Leucine is a branched chain amino acid that has been extensively studied due to its effects on protein metabolism, such as enhancing protein synthesis and decreasing protein degradation. C₂C₁₂ myoblast cells were differentiated into myotubes and treated with rapamycin to inhibit mTOR's activities. After this, the myotubes were supplemented with leucine to evaluate the signalling pathways modulated by this BCAA and to assess the possible dependence of mTOR in these results. Leucine-treated myotubes increased p70S6K in cells treated with rapamycin. These findings showed that there might be a direct stimulation or a parallel pathway, independent to mTOR, through which leucine could act in myotubes' protein synthesis. Leucine also decreased Smad2 and inactivated FoxO in myotube cells treated with rapamycin, showing a synergic rapamycin effect. Therefore, leucine increased both oxygen consumption and the cathepsin B activities in C₂C₁₂ myotubes, independent of rapamycin inhibition. These results demonstrated that leucine modulated protein metabolism and signalling pathways of energetic metabolism independent of mTOR activation in C₂C₁₂ myotubes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 4E-BP1** - proteína de ligação ao fator eucariótico de iniciação da tradução 4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*)
- AGC** – proteína quinase dependente de AMPc e GMPc (*cAMP-dependent protein kinase/cGMP-dependent protein kinase/protein kinase C*)
- AKT/PKB** - proteína quinase B (*protein kinase B*)
- AMPc- AMP** - adenosina 3',5'-monofosfato (3',5' *adenosine monophosphate*)
- AMPK** - proteína quinase ativada por AMP (5' *AMP-activated protein kinase*)
- ATP** - adenosina Trifosfato
- BCAA** - aminoácido de cadeia ramificada (*branched chain amino acids*)
- Brij-35** - polioxietilenolauril éter (*polyethylene glycol dodecyl*)
- C₂C₁₂** - linhagem celular de mioblasto de camundongo
- Cdc42** – proteína de controle da divisão celular, homologa 42 (*cell division control protein 42 homolog*)
- CO₂** - dióxido de carbono
- DMEM** – meio de cultura enriquecido (*Dulbecco's Modified Eagle's médium*)
- DMSO** - dimetil sulfóxido (*dimethyl sulfoxide*)
- EDTA** - ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylene diamine tetraacetic acid*)
- EGTA** - ácido etileno glicol tetra -acético (*ethylene glycol tetraacetic acid*)
- eIF4A** - fator de iniciação eucariótico 4A (*eukaryotic initiation factor 4A*)
- eIF4F** - fator de iniciação eucariótico 4F (*eukaryotic initiation factor 4F*)
- eIF4G** - fator de iniciação eucariótico 4G (*eukaryotic initiation factor 4G*)
- FCCP** - *carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine*
- FoxO** - fator de transcrição *forkhead* (*forkhead transcription factors*)
- GMPc** - monofosfato cíclico de guanosina
- H₂O** - água
- HEPES** - ácido 2-[4[(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanossulfônico (4-(2Hydroxyethyl)-*piperazine-1-ethanesulfonic acid*)
- HSP** – proteína chaperona (*Heat Shock Protein*)
- IKK** – enzima inibidora do fator nuclear kappa b (*Enzyme IKB Kinase*)
- IL** - interleucina (*interleukin*)
- JAK** - Janus Kinase

KCl - cloreto de Potássio

KHB - tampão de *Krebs-Henseleit* (*Krebs-Henseleit buffer*)

KH₂PO₄ - fosfato de potássio monobásico

LC3 – proteína associada ao microtúbulo (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*)

MgSO₄ - sulfato de Magnésio

mTOR - proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin*)

mTORC1 - complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos (*mTOR Complex 1*)

mTORC2 - complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos (*mTOR Complex 2*)

MuRF1 - proteína RING-finger de músculo (*Muscle RING-finger protein-1*)

Na₂HPO₄ - fosfato disódico

NaCl - Cloreto de Sódio

NaHCO₃ - bicarbonato de sódio

NFKB – Fator nuclear kappa B (*Nuclear Kappa B*)

PDE - fosfodiesterase (*phosphodiesterase*)

PBS - tampão fosfato-salino (*phosphate-buffered saline*)

PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase (*phosphatidylinositol-3 kinase*)

PIKK - quinase da família da fosfatidilinositol 3-quinase (*phosphoinositide 3kinase (PI3K)-related kinase*)

PKA - proteína kinase A

PKC - proteína kinase C

PKG - proteína kinase G

PMSF - fluoreto de fenil-metano-sulfonil (*phenylmethane sulfonyl fluoride or phenyl-methylsulfonyl fluoride*)

PRAS - substrato de AKT rico em prolina (*Proline-rich AKT substrate*)

RAS - proteína RAS

Ub – ubiquitina (*ubiquitin*)

UPS - Sistema ubiquitina proteossomo (*ubiquitin-proteasome system*)

Rac – substrato da toxina botulinica relacionada a Ras (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)

RAG - GTPase da família Ras (*Ras-related GTPase*)

Rheb – proteína de cerebro homologa a Ras (*Ras homolog enriched in brain*)

RNA - ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

S6K - proteína quinase ribossomal S6 (*Ribosomal protein S6 kinase 1*)

Sirt – sirtuina (*Sirtuin*)

Smad - proteína semelhante ao fator de crescimento transformador β (*Small protein mothers against decapentaplegic*)

STAT - sinal de transdução e ativador de transcrição (*Signal Transducers and Activators of Transcriptions*)

TBS - Tampão salino - TRIS (*Tris-buffered saline*)

TGF β - fator de crescimento transformador β (*transforming growth factor β*)

TRIS - 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

TSC – complexo de esclerose tuberosa (*Tuberous sclerosis complex*)

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO.....	13
II.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
A.	Tecido muscular esquelético como fonte de substrato energético	15
B.	Síntese de proteína e ganho de massa muscular	16
	O papel da mTOR no crescimento celular.....	16
	Controle e regulação da síntese de proteína.....	18
C.	Caquexia e degradação muscular	19
	Miostatina como modulador da atrofia.....	21
D.	Abordagens terapêuticas.....	22
III.	OBJETIVO	24
A.	Geral.....	24
B.	Específicos	24
IV.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
A.	Cultura Celular.....	25
B.	Protocolo experimental.....	25
C.	Western Blot.....	26
D.	Enzimas de degradação	27
E.	Consumo de oxigênio	27
F.	Coloração com cristal Violeta	28
G.	Concentração de Proteína.....	28
H.	Análise estatística.....	29
V.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
A.	Efeitos da leucina sobre a via da mTOR	30
B.	Efeitos da leucina sobre proteínas associadas a degradação de proteína	

C.	Efeitos da leucina sobre atividade enzimática de enzimas de degradação	36
D.	Efeitos da leucina sobre o consumo de oxigênio.....	41
VI.	CONCLUSÃO	44
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
VIII.	ANEXOS.....	54

I. INTRODUÇÃO

Muitas síndromes metabólicas causam desbalanço energético, alterando as fontes energéticas e levando o indivíduo ao estado de intensa desnutrição.

Dentre essas síndromes, temos a caquexia que acomete muitos pacientes com câncer, sendo que, além de instalar processo inflamatório crônico, é capaz de causar catabolismo, através de intensa espoliação tanto de tecido adiposo quanto de tecido muscular esquelético.

A leucina, por ser um aminoácido essencial de cadeia ramificada com ação sinalizadora, tem sido objeto de muitos estudos por demonstrar efeitos benéficos no metabolismo proteico muscular, agindo através do estímulo da síntese e/ou, ao mesmo tempo, reduzindo a degradação de proteínas. Entretanto, o modo pelo qual esse aminoácido é capaz de modular vias de sinalização do metabolismo proteico ainda é controverso. Alguns estudos demonstram que a leucina é capaz de atuar diretamente via mTOR (*mechanistic* ou *mammalian target of rapamycin*) - proteína chave na cascata de sinalização de crescimento, diferenciação, síntese de proteínas e proliferação celular - enquanto outros autores afirmam que a leucina atua em proteínas *upstream* na via da mTOR, seja através da AKT (*protein kinase B*) ou através das RAGs (*Ras-related GTPases*). Há estudos, ainda, que apontam que a leucina não é capaz de atuar diretamente estimulando a síntese e sim através da diminuição do catabolismo proteico, seja via miostatina - uma proteína da família dos TGF β (*Transforming Growth Factor* β) - ou através da supressão do sistema ubiquitina-proteossomo (UPS).

De qualquer maneira, a leucina possui papel positivo no *turnover* proteico, o qual precisa ser melhor elucidado.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar pontos da via de atuação da leucina na sinalização celular, avaliando tanto a síntese como a degradação de proteína em cultura celular de mioblastos C₂C₁₂ diferenciados em miotúbulos. Como alvo do estudo, foram selecionadas duas proteínas chaves que controlam esse metabolismo proteico: mTOR e miostatina. Além disso, também buscamos avaliar alterações no metabolismo

celular sob influencia da leucina, que podem estar associadas com a maior eficiência na obtenção de energia, permitindo melhora nos processos celulares como um todo.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A. Tecido muscular esquelético como fonte de substrato energético

O músculo esquelético, constituinte da maior parte da musculatura corpórea, tem como característica particular a capacidade de estocar glicose na forma de glicogênio, para o seu próprio fornecimento de energia, como também pode disponibilizar aminoácidos, contidos na sua estrutura, na forma de proteínas, que podem ser mobilizadas dependendo das necessidades do organismo (WOLFE, 2006).

Durante a situação de jejum prolongado para o organismo adulto, parte da glicose sanguínea circulante é proveniente de aminoácidos, em geral oriundos do catabolismo proteico da musculatura esquelética. Essa glicose é obtida a partir da gliconeogênese, principalmente ocorrida no fígado. Além disso, nos demais tecidos, os aminoácidos também podem entrar no ciclo do ácido carboxílico e gerar acetil-coenzima A, como forma de provimento energético (SHRAYYEF; GERICH, 2010).

A manutenção do conteúdo de proteína muscular depende tanto da síntese de proteína, como de sua degradação (FRONTERA; OCHALA, 2015).

Quando as vias de síntese estão mais estimuladas do que as vias de degradação, o músculo ganha massa, aumentando de tamanho e assim hipertrofiando a musculatura esquelética. Quando as vias de degradação estão mais ativas do que o processo de síntese, há intenso processo catabólico, aumentando a espoliação das proteínas estruturais, e como consequência o músculo diminui de tamanho, sofrendo atrofia.

O processo de hipertrofia é essencialmente regulado pela mTOR, cuja sinalização é induzida pela tanto pela ingestão calórica quanto proteica, que desencadeiam a liberação de insulina e hormônios anabólicos como hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento similar a insulina (IGF-1), assim como pela atividade física (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

Os estímulos que geram mobilização de proteínas podem ser tanto pelo aumento da demanda energética como pela depleção das reservas energéticas. Como exemplo para esses estímulos, podemos citar tanto o hipermetabolismo induzido por estresse (como a liberação de hormônios catabólicos), quanto um longo período de jejum (jejum prolongado acima de 72hs) (ARGILÉS et al., 2016).

Além desses exemplos, que podem ser reversíveis, podemos considerar doenças que requerem intensa quantidade de substratos energéticos, como a caquexia - síndrome frequentemente associada a alguns tipos de câncer. Nesse caso, o músculo participa ativamente no balanço do metabolismo, sendo mobilizada a proteína estrutural, ofertando assim aminoácidos a serem utilizados como substratos energéticos, via cadeia fosforilativa para a produção de ATPs; já que outros órgãos não são capazes de suprir essas necessidades do organismo (ARGILÉS et al., 2016).

Dessa maneira, o presente trabalho irá avaliar o papel da leucina em modular vias de sinalização associadas à síntese e degradação de proteína como uma possível maneira de reduzir o processo de atrofia que ocorre no câncer-caquexia, o qual piora drasticamente o desenvolvimento da doença e necessita de grande investimento por parte do sistema de saúde pública.

B. Síntese de proteína e ganho de massa muscular

O papel da mTOR no crescimento celular

A mTOR (*mechanistic* ou *mammalian target of rapamycin*) é uma serina/treonina quinase que controla o crescimento/atividade celular em resposta aos nutrientes, fatores de crescimento e energia, porém a disfunção dessa proteína está relacionada à várias doenças, dentre elas o câncer (TAVARES et al., 2015; ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2011).

A mTOR é formada por dois complexos distintos: mTOR complexo 1 (mTORC1) e mTOR complexo 2 (mTORC2), onde esses dois complexos diferem quanto suas subunidades. Enquanto o primeiro é definido pela

subunidade Raptor, o segundo é definido pela subunidade Rictor (HARA et al., 2002; KIM et al., 2002).

O primeiro complexo - mTORC1 - regula o crescimento celular através da promoção de transcrição, biogênese ribossomal e autofagia, enquanto o segundo complexo - mTORC2 - é responsável por promover o desencadeamento do ciclo celular, sobrevivência celular, polarização do citoesqueleto de actina e produtos anabólicos (HARA et al., 2002; KIM et al., 2002; SHAW; CANTLEY, 2006; ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2011).

Na presença de nutrientes e aminoácidos, o complexo mTORC1 é ativado pelo recrutamento da mTOR e ligação aos compartimentos lisossomais e endossomais, ligando-se a Raptor, dependente da co-localização do seu ativador, Rheb (*Ras-homolog enriched in brain*), uma GTPase de baixo peso molecular, formando assim o mTORC1 ativo (SAUCEDO et al., 2003; STOCKER et al., 2003).

O mecanismo proposto pelo qual Rheb ativa mTORC1 incluem tanto (1) ligação ao domínio quinase de mTORC1 quanto (2) remoção de PRAS40 (*proline-rich Akt/PKB substrate 40KDa*), um inibidor de Raptor e também da fosforilação da S6K1 (*p70 ribossomal S6 kinase 1*) (SANCAK et al., 2007; SATO et al., 2009). Por sua vez, a Rheb é regulada negativamente por TSC (*trimeric tuberous sclerosis complex*), através da hidrólise de GTP.

Formado por dois complexos, TSC1 e TSC2, TSC é uma proteína inibidora da *Rheb*. Esse complexo TSC1/2 é ativado, principalmente, pela falta de energia - via AMPK (*AMP-activated protein kinase*). Dessa maneira, uma vez ativado, o TSC inibe Rheb e, consequentemente, mTORC1 (JEWELL; RUSSELL; GUAN, 2013).

Fatores de crescimento ativam Akt, regulador negativo de TSC, permitindo assim a ativação de mTORC1 (SENGUPTA; PETERSON; SABATINI, 2010; WANG; PROUD, 2009; YANG; GUAN, 2007).

Embora existam vários substratos da mTORC1, evidências mostram que 4EBP1 (*eukariotic initiation factor 4E binding protein 1*) e S6K1 são os substratos mais importantes em promover o aumento do tamanho das células,

induzindo tanto crescimento/proliferação celular com também síntese proteica (Fingar et al., 2002). Dessa forma, a fosforilação de S6K (Thr389/412) em células é rotineiramente usada como reflexo da atividade dessa quinase de mTORC1 (WENG et al., 1998).

4EBP1 é o inibidor do fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E), pois encontra-se sempre ligado a esse fator de transcrição. Ao ser fosforilado pela mTORC1, a 4EBP1 desliga-se do fator eIF4E, permitindo sua ligação ao eIF4G, dando início a tradução de proteínas.

S6K1 e S6K2 fazem parte da família quinase AGC, assim como PKA (proteína quinase A (dependente de AMPc)), PKC (proteína quinase C (dependente de cálcio)), PKG (proteína quinase G (dependente de GMPc)) e Akt, que são serina-treonina quinases envolvidas em vários processos celulares (MAGNUSON; EKIM; FINGAR, 2012).

A via de sinalização mTOR/S6K1 está relacionada com várias doenças e processos celulares como: 1) inibição de apoptose (HARADA et al., 2001; LAI et al., 2010); 2) organização de citoesqueleto e migração celular (IP et al., 2011); 3) inibição de processo inflamatório (KIM et al., 2014), 4) síntese de proteína, sobrevivência e progressão do ciclo celular (DENNIS; JEFFERSON; KIMBALL, 2012; LIWAK et al., 2012; NARAYANAN et al., 2008); 4) *splicing* de RNA (DENNIS; JEFFERSON; KIMBALL, 2012; RICHARDSON et al., 2004); 5) proteínas chaperonas (*heat shock protein - HSP*) (ABE et al., 2009) e 6) metabolismo celular (DAGON et al., 2012; UM et al., 2004).

Controle e regulação da síntese de proteína

O controle da tradução é um processo de múltiplos passos que envolve a disponibilidade dos fatores de iniciação eucarióticos (eIFs) e ativação da proteína ribossomal S6K1 (SHAH et al., 2000). A iniciação da tradução começa pela ligação do eIF2 ao GTP e ao met-tRNA_i, formando o complexo ternário eIF2- GTP- met-tRNA_i. Parte deste complexo ternário liga-se a subunidade ribossomal 40S, estabelecendo o complexo pré-iniciador 43S. Para que este complexo possa reconhecer e ligar-se ao RNAm é necessário a

atuação do complexo eIF4F, formado pelas proteínas: eIF4A, eIF4B, eIF4G e eIF4E.

O complexo eIF4F promove, por sua vez, a ligação do complexo pré-iniciador 43S com a subunidade ribossomal 60S, estabelecendo a unidade 80S. O complexo eIF4F atua reconhecendo e guiando o RNAm durante o processo de tradução.

O fator eIF4E, associado ao eIF4G, identifica a região terminal 5' do RNAm na posição m7GTP (SHAH; HUNTER, 2006; SHAH et al., 2000). Após o reconhecimento do códon AUG (metionina), inicia-se a tradução onde o movimento do complexo pelo RNAm é guiado pela atividade do eIF4A, estimulado pelo eIF4B.

O mecanismo pelo qual a atividade do complexo eIF4F regula a iniciação da tradução envolve a modulação e a disponibilidade de eIF4E. O fator eIF4E pode ligar-se tanto com 4EBP1 (repressor da tradução) como com o fator eIF4G, mas não ao mesmo tempo. Por isso, enquanto eIF4E estiver associado ao 4E-BP1, o RNAm não se liga à unidade ribossomal 80S.

A dissociação do 4EBP1 é regulada pela atividade da proteína mTOR, que fosforila a 4EBP1 e, conseqüentemente, causa dissociação do complexo liberando eIF4E, permitindo-o à associar-se a eIF4G (KIMBALL; JEFFERSON, 2006; KIMBALL et al., 2004; PROUD, 2009).

Aminoácidos podem ser reguladores positivos da mTOR. O mecanismo pelo qual os aminoácidos influenciam a síntese proteica ainda não está bem esclarecido, mas estudos sugerem que a síntese proteica é aumentada quando ocorre aumento da disponibilidade dos aminoácidos intracelulares (PROUD, 2011, 2013).

C. Caquexia e degradação muscular

A caquexia é definida como uma síndrome multifatorial que leva à perda acentuada de peso corporal, de forma involuntária e irreversível. Tanto o

tecido adiposo e principalmente o tecido muscular são intensamente degradados.

Essa síndrome é diagnosticada quando há perda a partir de 5% da massa magra, em menos de seis meses, quando por exemplo na presença de patologia como o câncer. Além disso, há perda de musculatura esquelética, aumento da fadiga, anorexia, “*low fat-free mass index*”, parâmetros bioquímicos anormais, como: aumento de marcadores inflamatórios como proteína C reativa (>5.0 mg/L) ou interleucina-6 (IL-6) (>4.0 pg/mL), anemia (hematócrito <12 g/dL), ou baixa concentração de albumina (<3.2 g/dL). (ARGILÉS et al., 2016).

Entretanto, estudos experimentais demonstraram que prevenindo a perda de tecido muscular, a sobrevivência de ratos com tumor é aumentada, evidenciando que a espoliação da musculatura possui papel fundamental na progressão da doença (TISDALE, 2001; TOLEDO et al., 2016; ZHOU et al., 2010).

A caquexia está intimamente relacionada ao câncer, acometendo cerca de metade dos pacientes, dependendo do tipo de tumor, sendo responsável por um terço das mortes causadas por esta patologia (FEARON et al., 2011; VON HAEHLING; ANKER, 2010).

A frequência da perda de peso é variável, podendo atingir 31% em pacientes com linfoma não-Hodgkins e até 87% em pacientes com câncer gástrico. A taxa média de sobrevivência e a resposta à quimioterapia são menores em pacientes com intensa perda de peso associada ao câncer (TISDALE, 2004, 2005), evidenciando a relação inversa entre a perda de peso e o prognóstico destes pacientes. Assim, o insucesso do tratamento clínico do paciente com câncer-caquexia torna-se ainda mais evidente, pois além da severa perda de peso, vários sintomas como anorexia, saciedade prematura, anemia, edema e astenia estão associados (FEARON, 2008; FEARON et al., 2011; TISDALE, 1999, 2000, 2010). Esses sintomas são, principalmente, decorrentes de anormalidades no metabolismo de proteínas, cuja alteração no *turnover* proteico corpóreo promove redução da síntese associada ao aumento da degradação proteica no músculo esquelético (INUI, 1999, 2002; TISDALE, 2001, 2009, 2010), contribuindo assim para a atrofia muscular.

Devido ao reconhecimento da mortalidade e morbidade associadas ao câncer-caquexia, diversos estudos buscam o melhor esclarecimento das razões fundamentais da perda de peso durante a caquexia no câncer, visando o planejamento de formas específicas de suporte nutricional ou de intervenção metabólica, que poderiam influenciar de forma mais favorável às respostas do hospedeiro/paciente frente aos efeitos deletérios do câncer (FEARON et al., 2003, 2006). Além disso, a melhor compreensão a cerca de potenciais moduladores do processo câncer-caquexia poderia ser utilizada para ampliar e melhorar as formas terapêuticas (TISDALE, 2005; RUSSELL et al., 2009; TISDALE, 2010). As principais vias que estão ativadas pela caquexia e que são responsáveis pela degradação de tecido muscular são: 1) via Akt-FoxO (forkhead family transcription fator), que esta relacionada diretamente à ativação da via ubiquitina-proteossomica e autofágica/lisossomal; 2) via IKK-NF- κ B ((*enzyme I κ B kinase e nuclear factor-kappa B (NF- κ B) -activation*) relacionada principalmente com ubiquitinases; 3) via JAK-STAT3 (*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*) envolvida nos processos pro-inflamatórios relacionados às citocinas; 4) via TGF β /Myostatin-Smad2/3 (*tumour/transforming growth fator β / myostatin e protein Smad pathway*) também relacionada à citocinas pro-inflamatórias (SANDRI, 2015).

Miostatina como modulador da atrofia

Nessa revisão, optamos por elucidar a via de sinalização da miostatina e como ela é modulada. A miostatina é membro da superfamília dos TGF- β (fator de crescimento transformador- β) e também das BMP (*bone morphogenetic protein*)), e seus efeitos inibitórios têm sido demonstrados na diferenciação e crescimento muscular (MCCROSKERY et al., 2005). A miostatina, inibidor autócrino do crescimento muscular, liga-se ao receptor ativina A – tipo IIB (ActRIIB) no músculo esquelético e cardíaco, induzindo atrofia da fibra através da ativação de fatores de transcrição SMAD2 e SMAD3 e atua também através da inibição da proliferação das células satélites (MCCROSKERY et al., 2003; SARTORI et al., 2009; WAGNER et al., 2002). Além disso, a miostatina também inibe a atividade das células satélites durante a regeneração muscular, controlando a migração de macrófagos e inibindo a

multiplicação de mioblastos, assim como sua diferenciação (RÍOS et al., 2002; WHITTEMORE et al., 2003). Alguns autores demonstram também que a miostatina reduz síntese proteica muscular por inibir a sinalização da mTORC1 (GOODMAN et al., 2013; HULMI et al., 2009).

Esses efeitos também foram confirmados em modelos *in vitro*, em cultura de miotúbulos, C₂C₁₂, onde a miostatina reduziu a proliferação, diferenciação e a síntese proteica (MCCROSKERY et al., 2003; RÍOS et al., 2002; TAYLOR et al., 2001).

A atividade da miostatina é regulada por um antagonista funcional de membros da família do TGF- β , a follistatina (AMTHOR et al., 2004; MCPHERRON; LAWLER; LEE, 1997), que pode ser alvo para futuras terapias, que visam o aumento/preservação da massa muscular.

D. Abordagens terapêuticas

Para prevenir a perda de massa magra ou mesmo mantê-la, é indicada quantidade suficiente de proteínas na dieta, já que, para que haja síntese, é necessário que sejam providos aminoácidos essenciais como substrato (MILNE et al., 2009).

Pensando nisso, a alternativa mais plausível é a suplementação com aminoácidos, mais especificamente os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), especialmente leucina. É conhecido que a síntese de proteína muscular é modulada por BCAAs. Estes, além de aumentarem a síntese de proteína, também reduzem a degradação (ARGILÉS et al., 2016). Os BCAAs, leucina, valina e isoleucina, assumem importante papel regulatório no metabolismo proteico (PROUD, 2007).

No estado câncer-caquexia, o aumento do consumo alimentar não é capaz de reverter às alterações metabólicas observadas nos pacientes, porém, estudos têm mostrado análises específicas para uso de terapias coadjuvantes no sentido de minimizar os efeitos do estado caquético (CASPERSON et al., 2012; FEARON, 2008; VERHOEVEN et al., 2009).

A leucina, além de importante combustível metabólico da musculatura esquelética, possui a capacidade de participar da cadeia fosforilativa (ciclo do ácido tricarboxílico) através do succinato, também tem papel importante na sinalização celular do músculo esquelético e pode aumentar a síntese proteica e/ou diminuir a proteólise muscular, independente dos outros aminoácidos de cadeia ramificada, como a isoleucina e a valina (ANTHONY et al., 2000, 2002a; COFFEY et al., 2011). Os BCAAs possuem ações inibitórias na proteólise da musculatura esquelética, podendo modular sua taxa em estados catabólicos, exercendo controle de *realimentação* negativo também *in vivo* (HOLECEK; KOVARIK, 2011).

Leucina estimula a síntese proteica muscular esquelética por mecanismos independente da insulina. Esse BCAA modula a atividade dos fatores eucarióticos da iniciação (eIFs) através das vias dependente e independente de mTOR (ANTHONY et al., 2002b; CROZIER et al., 2005; HOLECEK, 2001, 2002, 2012; PROUD, 2011, 2013).

A leucina é conhecida por ativar a sinalização da mTOR, e também de reduzir a proteólise muscular (ANTHONY et al., 2001; COMBARET et al., 2005; STIPANUK, 2007). Mobley e colaboradores demonstraram que a leucina, o hidroximetilbutirato (HMB) e a creatina monohidratada conseguiram reverter a atrofia muscular causada pela miostatina em miotúbulos (MOBLEY et al., 2014). Além disso, Chen e colaboradores mostraram que a leucina reduziu a expressão de mRNA de miostatina em C₂C₁₂ tratadas com leucina, na concentração 1mM de tratamento (CHEN et al., 2013).

Dessa forma, há indícios que, reduzindo a expressão da miostatina, os seus efeitos inibitórios em miotúbulos podem ser anulados, provavelmente sendo este o caminho a ser estudado para melhorar a síntese proteica muscular, minimizando ou mesmo interrompendo a atrofia muscular, em pacientes com câncer-caquexia. Sendo assim, torna-se importante estudar o mecanismo de ação desses aminoácidos no músculo com o intuito de melhorar as abordagens terapêuticas.

III. OBJETIVO

A. Geral

Tendo em vista a necessidade de compreender os mecanismos pelos quais a leucina modula o metabolismo proteico em células musculares, e sabendo que a mTOR é a proteína chave para síntese de proteína, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos anti-proteolíticos e estimuladores de síntese, da mTOR sob influência da leucina em cultura de células C₂C₁₂ diferenciadas em miotúbulos.

B. Específicos

1. Avaliar os efeitos da leucina na via de sinalização da mTOR, por meio da expressão das proteínas relacionadas a essa via de sinalização como: Akt, mTOR e p70S6K;
2. Avaliar os efeitos anti-proteolíticos da leucina, tanto pela via da miostatina quanto pelo sistema de ubiquitina-proteossomo, por meio da expressão das proteínas: miostatina, Smad2, FoxO3a e subunidades do sistema ubiquitina-proteossomo: 11S, 19S, 20S, assim como atividade da quimiotripsina;
3. Avaliar a dependência da mTOR para os efeitos encontrados nos grupos tratados com leucina, por meio da comparação de amostras tratadas com inibidor da mTOR - rapamicina - com amostras controle - não tratadas.
4. Avaliar se a leucina possui efeito no metabolismo celular a fim de melhorar vias de obtenção de energia.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

A. Cultura Celular

Células C₂C₁₂, correspondentes a mioblastos isolados de músculo esquelético de camundongo (*Mus musculus*), foram cultivadas em meio DMEM - High Glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino, acrescido com 1% de penicilina e 1% de glutamina, sob atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C. O meio foi renovado em intervalos de 48 horas e os subcultivos foram realizados sem que as células atingissem a confluência.

Para os experimentos, células C₂C₁₂ foram cultivadas até a confluência, em placas de 6 poços, na concentração inicial de 1,0x10⁵ células/poço, ou em garrafas de 25 cm² a concentração inicial de 2,0x10⁵ células/garrafa. Os mioblastos foram, então, diferenciados em miotúbulos, utilizando-se meio DMEM - High Glucose suplementado com 2% de soro fetal equino, acrescido com 1% de penicilina e 1% de glutamina. As trocas de meio foram efetuadas a cada 24 ou 48 horas.

B. Protocolo experimental

As células C₂C₁₂ foram cultivadas até sua total diferenciação e então tratadas segundo esquema abaixo (Esquema 1). Células C₂C₁₂ foram expostas ou não, previamente a 80mM de rapamicina por uma hora. Após esse tempo, foi acrescido 2mM de leucina isolada ou em conjunto com 80nM de rapamicina por mais 1 hora. Dessa maneira o tempo total de experimento foi de 2 horas:

TEMPO		0hs	1hs	2hs
Grupos	Controle	-	-	Coleta de amostra
	Leucina	-	Leucina 2mM	Coleta de amostra
	Rapamicina	Rapamicina 80nM	Rapamicina 80nM	Coleta de amostra
	Rapamicina e Leucina	Rapamicina 80nM	Rapamicina 80nM e Leucina 2mM	Coleta de amostra

Esquema representativo do tratamento em miotúbulos.

C. Western Blot

Amostras de células de mioblastos, C₂C₁₂, diferenciadas em miotúbulos foram obtidas em tampão para extração de proteínas da MerkMillipore (EUA) adicionado EDTA 10 mM, EGTA 100mM, PMSF 2 mM, aprotinina 0.1 mg/mL e diluídas em *loading buffer* (2x) (LAEMMLI, 1970). As proteínas foram separadas utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com gel de empilhamento (*stacking gel*) e de separação (*resolving gel*). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (malha de 0,22µm) e posteriormente incubadas com solução de bloqueio, contendo leite desnatado a 5% em TBS-Tween 0,1%, por 2 h, em temperatura ambiente. Utilizou-se anticorpos primários específicos para Akt total, Akt fosforilada, mTOR total, mTOR fosforilada, p70S6K total e p70S6K fosforilada (diluição 1:1000, Cell Signalling Technology, EUA) 20S, 19S e 11S (diluição 1:1000, Biomol, Alemanha), LC3, miostatina, Smad-2 total e Smad2/3 fosforilada (diluição 1:1000, Sigma), FOXO3a total e , FOXO3a fosforilada (diluição 1:500, Santa Cruz Biotechnology, EUA), sendo o controle interno anticorpo para GAPDH (1:1000, MerkMillipore, EUA). Incubou-se as membranas com anticorpo primário por 12 horas, a 4°C e, posteriormente, as membranas foram lavadas com TBS-Tween 0,1% e incubadas com anticorpos secundários (anti-rabbit, anti-mouse, na diluição 1:10000, Cell Signalling Technology, EUA) em solução contendo 3% de leite desnatado em TBS-Tween 0,1% por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se as membranas com TBS-Tween 0,1% por 3 vezes por 5 minutos e a reação de quimioluminescência foi realizada utilizando-se reagente Luminata Forte (MerkMillipore, EUA). A análise densitométrica foi feita utilizando-se fotodocumentador para capturar as imagens e a quantificação foi feita utilizando-se programa UVIttec (UVIttec Cambridge, Reino Unido).

D. Enzimas de degradação

Amostras de células foram adicionadas a TRIS 100mM gelado e homogeneizadas em ultrassom por 3 vezes de 5 segundos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x rpm, 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para determinação da quantidade de proteínas totais, através do método colorimétrico utilizando reagente de folin/fenol (LOWRY et al., 1951) e avaliação da atividade das enzimas catepsina B, catepsina H, e quimotripsina. Para a análise da atividade da catepsina B, foi adicionado a alíquota do sobrenadante o substrato de catepsina B 0,02 mM (Z-Phe-Arg-NMec (SigmaAldrich, EUA) dissolvido em DMSO) diluído em tampão Brij-35 0,1%. Para a análise da atividade da catepsina H, alterou-se o tampão para KH_2PO_4 200 mM, Na_2HPO_4 200 mM, pH 6,8 e o substrato da enzima utilizado (Arg-NMec (SigmaAldrich, EUA) dissolvido em DMSO). Para ambas enzimas a fluorescência foi monitorada em fluorímetro com filtros de excitação/emissão de 350/460 nm durante 20 minutos, com intervalos de 1 minuto (BARRETT, 1980). A atividade de ambas as enzimas foi expressa como unidade arbitrária de fluorescência por miligrama de proteína, avaliada por Lowry. A atividade de quimotripsina-like foi analisada adicionando-se alíquota do sobrenadante a 0,167 $\mu\text{g/L}$ de substrato da enzima (succinyl-Leu-Leu-Val-Try-7- amino-4-methylcoumarin, (SigmaAldrich, EUA) diluído em tampão Tris-HCl, pH 7,4). A variação na fluorescência foi monitorada em fluorímetro com filtros de excitação/emissão de 350/460 nm durante 30 minutos, com intervalos de 1 minuto (ORINO et al., 1991). A atividade da enzima foi normalizada pela concentração de proteína e expressa em unidades arbitrárias por miligrama de proteína.

E. Consumo de oxigênio

As células foram mantidas em garrafas T25 cm^2 durante o crescimento, diferenciação e tratamento das amostras conforme descrito anteriormente.

Após tratamento, as células foram retiradas das garrafas, fazendo-se digestão da matriz com tripsina por 2 minutos a 37°C e centrifugadas para formação de *pellet* celular. Em seguida, o *pellet* celular foi ressuspensionado em

1ml de Krebs Ringer (119mM NaCl, 4,8mM KCl, 1,5mM KH_2PO_4 , 1,2mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50mM NaHCO_3) contendo 25mM glicose e 10mM HEPES, pH 7,4.

O número de células foi obtido por contagem em câmara de *Neubauer*, para normalização do experimento.

Para o consumo de oxigênio celular, foi utilizado 500 μL da suspensão celular em câmara do oxígrafo de alta resolução (Oroboros Oxygraph - 2K).

Após leitura inicial, a câmara foi fechada e o fluxo de oxigênio monitorado em tempo real. Após obtenção do consumo de oxigênio basal, foi adicionado 1 $\mu\text{g/ml}$ de oligomicina para obtenção do consumo mínimo de oxigênio, indicando vazamento de prótons pela membrana interna mitocondrial. Para induzir respiração mitocondrial, foi utilizado desacoplador FCCP a 250 μM .

Para obtenção e análise dos dados, foi utilizado o *software* DatLab4 (Oroboros Instrument, Innsbruck, Austrália).

F. Coloração com cristal Violeta

O meio de cultura foi removido e as células aderidas foram lavadas 2 vezes com PBS 1X gelado. As células foram fixadas com solução 1:1 de metanol e PBS por 10 minutos, seguido de mais 10 minutos com solução pura de metanol. A placa foi deixada secando e logo, em seguida, aos poços foi acrescida solução de cristal violeta diluída em água por mais 10 minutos. As células foram lavadas com água destilada e fotografadas em microscópio de luz.

G. Concentração de Proteína

A quantificação de proteína foi realizada segundo protocolo do fornecedor. Foi usado kit da Thermo, *Pierce™ Modified Lowry Protein Assay Kit*, onde o cálculo foi realizado a partir de uma curva de albumina.

H. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, EUA). Utilizando-se as médias e erro padrão das médias (SEM), e a comparação dos múltiplos grupos foi feita pelo teste ANOVA *two-way* seguido do teste de Bonferroni para detecção de diferenças significativas entre os grupos, para probabilidade menor que 5% (GAD; WEIL, 1994). Para verificar se as amostras apresentavam distribuição gaussiana utilizou-se o teste de D'Agostino e Pearson.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. Efeitos da leucina sobre a via da mTOR

Segundo a literatura, o tratamento com leucina em mioblastos diferenciados em miotúbulos com leucina, mostra que a modulação de proteínas associadas a via de síntese de proteína são controversos (ARETA et al., 2014; GIRÓN et al., 2016). Assim, ainda está pouco esclarecido o papel da leucina em ativar proteínas chaves relacionadas a essa via, principalmente quanto ao efeito sobre mTOR.

Concordante com a literatura, o tratamento com rapamicina, na dose de 80nM por período 1 hora, foi suficiente para inibir fosforilação da mTOR e p70S6K, mostrando que esse período de tratamento é capaz de inibir proteínas chaves da via de síntese de proteínas. (Figura 1B, C e E).

Com o objetivo de avaliar se a leucina foi capaz de estimular a via de síntese na situação controle, miotúbulos foram suplementados com leucina, na dose de 2mM por 1 hora. Nas condições estudadas, nossos resultados mostraram que esse tratamento não foi suficiente para estimular a fosforilação das proteínas envolvidas na via da mTOR, como, AKT e p70S6K. (Figura 1 A, B, D e E). Entretanto, foi interessante notar que, quando tratadas com rapamicina, as células responderam ao tratamento de maneira diferente. A suplementação com 2mM de leucina por 1 hora foi capaz de aumentar significativamente a fosforilação de p70S6K em células previamente tratadas com rapamicina, mostrando que, mesmo com mTOR inibida, a leucina pôde agir estimulando proteínas envolvidas na síntese de proteína, a fim de manter a homeostasia celular (Figura 1C e E). Esses resultados são importantes porque mostram que esse aminoácido pôde ser responsável por ativar a síntese de proteína de maneira independente de mTOR, ativando de forma paralela proteínas da família S6K1.

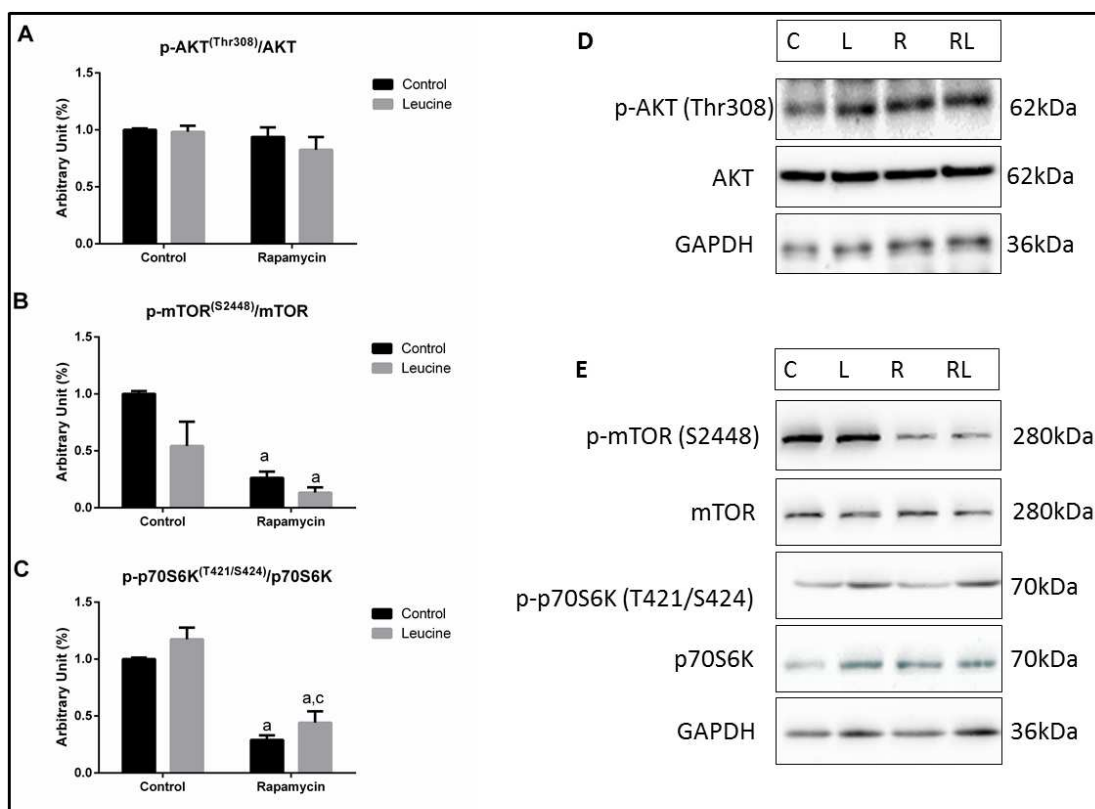


Figura 1: Expressão das proteínas chaves envolvidas na sinalização da síntese de proteínas em miotúbulos C2C12. Os gráficos foram obtidos pela razão das proteínas fosforiladas pelas totais, representando então o processo de ativação da proteína: A) razão p-AKT/AKT; B) razão p-mTOR/mTOR; C) razão p-p70S6K/p70S6K.; D-E) Imagens representativas da expressão das proteínas obtidas por Western Blotting. Foram realizados 4 experimentos independentes em triplicata. Legenda: C miotúbulos controle; L, miotúbulos tratados com 2mM de leucina por 1h; R, miotúbulos tratados com 80nM de rapamicina por 2 horas; RL, miotúbulos tratados com rapamicina e com leucina. Para detalhes veja seção de Materiais e Métodos. Análise estatística: Two-Way Anova com pós teste Bonferroni. a: $P < 0.05$ comparação entre o grupo controle; c: $P < 0.05$ comparação entre o grupo tratado com rapamicina.

Proteínas da família S6K podem ser fosforiladas por outras proteínas regulatórias além da mTOR, como é o caso de: PDK1, Rac1/Cdc42 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 / Cell division control protein 42 homolog*), SIRT1/SIRT2 (*Sirtuin*) (BLOUET; ONO; SCHWARTZ, 2008; CHOU; BLENIS, 1996; HONG et al., 2014). Dessa maneira, acreditamos que a leucina, na ausência de mTOR, pôde atuar em alguma dessas outras proteínas, permitindo assim, fosforilação de p70S6K, sem que mTOR estivesse ativa.

Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por Giron e colaboradores (GIRÓN et al., 2016). Os autores analisaram mioblastos de músculos esqueléticos de rato da linhagem L6.C11, que foram tratados com leucina, verificando que esses mioblastos não apresentaram estímulo para

aumento da síntese de proteína, atribuindo esse fato ao não aumento de fosforilação de AKT, mTOR e 4EBP1; porém os autores encontraram aumento apenas da p70S6K, que justificaria outras modulações celulares por eles investigadas.

Por outro lado, em outro estudo foi demonstrado que 1,5mM de leucina, concentração inferior à utilizada em nosso trabalho, já seria suficiente para aumentar fosforilação de mTOR, p70S6K e 4EBP1 em C₂C₁₂ e que os efeitos da leucina não foram dose dependentes (ARETA et al., 2014). Entretanto, esses autores mostraram que nessas células, mesmo com aumento da ativação da via mTOR, não houve incorporação de fenilalanina, revelando que esse estímulo não é suficiente para aumento real da síntese de proteína.

Quanto à fosforilação da AKT, não era esperado que houvesse aumento desta quinase, já que estudos da literatura mostraram que a leucina não estimula AKT (NOBUKUNI et al., 2005; WANG; PROUD, 2006; XU et al., 2000).

B. Efeitos da leucina sobre proteínas associadas a degradação de proteína

Com os resultados acima apresentados, foi estudado se a leucina estaria modulando também vias de degradação de proteína e se, novamente, esses possíveis efeitos seriam dependentes de mTOR. Mantendo-se o mesmo desenho experimental, tratamos previamente miotúbulos com rapamicina e depois associamos ou não a suplementação com leucina.

Em nossos resultados pudemos verificar que a suplementação com leucina não alterou a expressão de miostatina, Smad2 e FoxO3 (Figura 2), assim como subunidades do sistema ubiquitina-proteossomo, e também não alterou a atividade enzimática da quimotripsina (Figuras 3 e 4, respectivamente). Por outro lado, o tratamento com rapamicina promoveu, nos miotúbulos C₂C₁₂, redução na fosforilação de Smad2 (Figura 2), porém não apresentou alteração significativa na modulação da miostatina e não alterou a fosforilação da FoxO3 (Figura 2); esses dados apontam que mesmo com o decréscimo da fosforilação da Smad2 não houve alteração significativa da expressão da via ubiquitina-proteossomo (Figuras 3 e 4). Entretanto,

novamente foi interessante notar que, o tratamento prévio com rapamicina, foi capaz de alterar os efeitos da leucina na via de degradação (Figuras 2, 3 e 4). Na Figura 2A, pudemos observar que quando em associação com a rapamicina, a suplementação com leucina foi capaz de aumentar a expressão de miostatina, que esta por si só, seria efeito estimulatório para a degradação proteica via sinalização pelo receptor de activina B. Entretanto, o sinal de degradação não foi continuado, já que o tratamento com rapamicina reduz a expressão de Smad2. A leucina em associação com a rapamicina mostrou potencializar esse efeito inibitório da rapamicina, já que houve redução ainda mais expressiva da fosforilação de Smad2. Além disso, a Smad2 é capaz de inibir AKT e toda a sua sinalização de síntese. Os resultados aqui encontrados na Figura 1 não mostraram redução efetiva da fosforilação da AKT nesse miotúbulos, portanto possivelmente houve interação com outra via paralela a qual justificaria a manutenção da expressão das subunidades proteossômicas e também da atividade da quimotripsina. Outra possível explicação seria que uma vez a AKT expressa, ela seria capaz de inativar FoxO3 via fosforilação. Assim como observado no presente trabalho, a associação entre leucina e rapamicina foi capaz de inativar FoxO3 via fosforilação. FoxO3 é um fator de transcrição fosforilado por AKT. Quando fosforilado, ele fica impedido de migrar para o núcleo e, portanto, não conseguindo ativar proteínas de degradação (SANDRI, 2015; SARTORI et al., 2009). Dessa maneira, foi possível observar que o aumento da fosforilação do FoxO3, decorrente do tratamento com leucina e rapamicina, sugere que a leucina exerceu efeito anti-proteolítico em miotúbulos na ausência de mTOR.

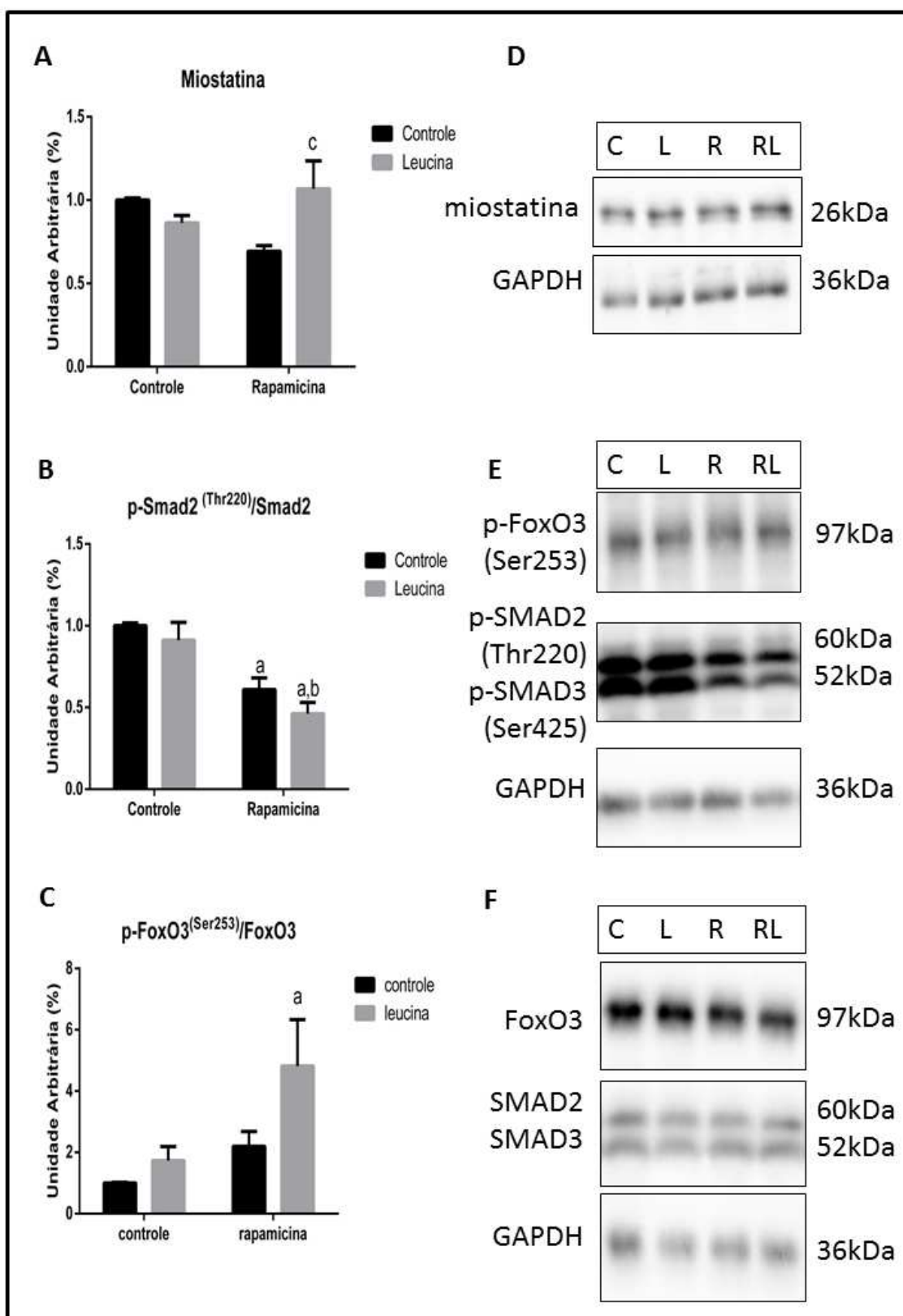


Figura 2: Expressão das proteínas envolvidas na degradação de proteínas via sinalização por miostatina em miotúbulos C2C12, tratados ou não com rapamicina e associação com leucina. A) miostatina; B) p-smad2/smad 2; C) p-FoxO3/FoxO3; D-F) Imagens representativas da expressão das proteínas analisadas por Western Blotting. Foram realizados 4 experimentos independentes em triplicata. Legenda: C miotúbulos controle; L, miotúbulos tratados com 2mM de leucina por 1h; R, miotúbulos tratados com 80nM de rapamicina por 2 horas; RL, miotúbulos tratados com

rapamicina e com leucina. Para detalhes veja seção de Materiais e Métodos. Análise estatística: *two -way* Anova com pós teste Bonferroni. a: comparado com controle; c: comparado com rapamicina

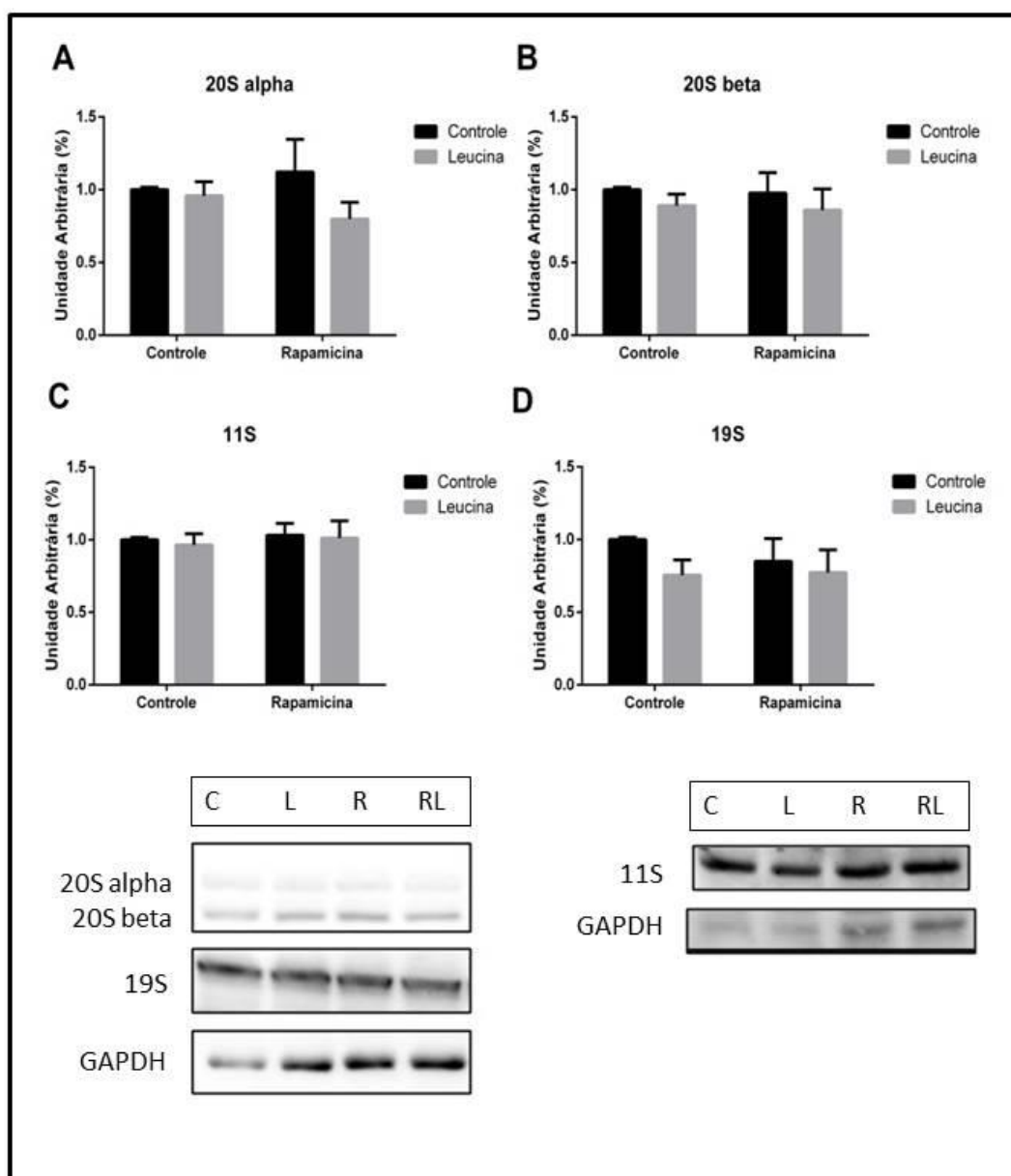


Figura 3: Expressão das proteínas envolvidas na degradação de proteínas via sistema ubiquitina-proteossomo em miotúbulos C2C12 tratados ou não com rapamicina associada a suplementação com leucina. A) subunidade proteossômica 20S alfa; B) subunidade proteossômica 20S beta; C) subunidade proteossômica 11S; D) subunidade proteossômica 19S subunidade beta. E-F) Imagens representativas da expressão das respectivas proteínas obtidas por análise Western Blotting. Foram realizados 4 experimentos independentes em triplicata. Legenda: C miotúbulos controle; L, miotúbulos tratados com 2mM de leucina por 1h; R, miotúbulos tratados com 80nM de rapamicina por 2 horas; RL, miotúbulos tratados com rapamicina e com leucina. Para detalhes veja seção de Materiais e Métodos. Análise estatística: *two -way* Anova com pós teste Bonferroni.

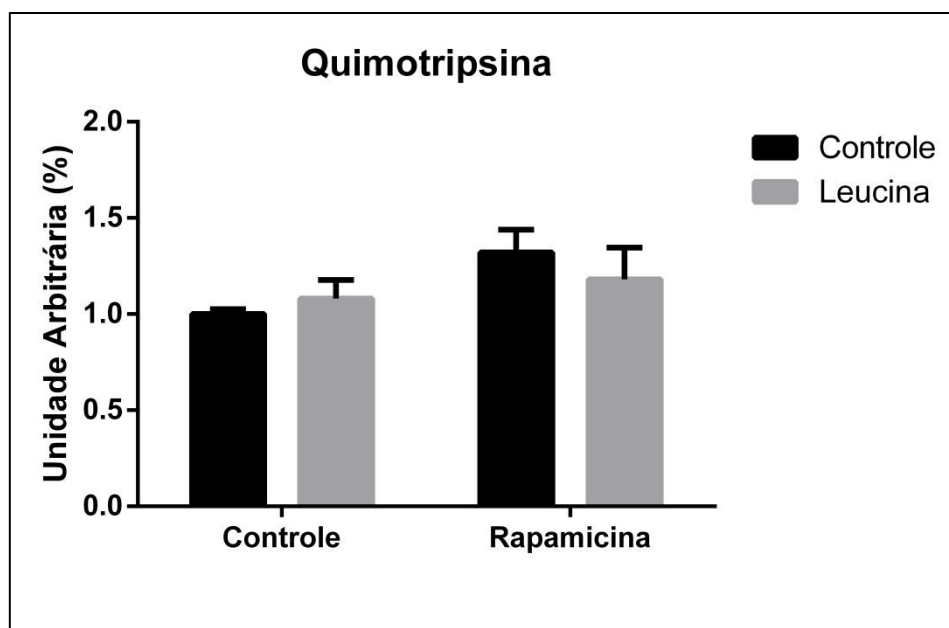


Figura 4: Atividade enzimática da quimotripsina em miotúbulos tratados ou não com rapamicina associado a suplementação com leucina. Para detalhes veja seção de Materiais e Métodos. Unidade arbitrária obtida por fluorescência. Foram realizados 2 experimentos independentes em triplicata. Análise estatística: *two-way* Anova com pós teste Bonferroni.

C. Efeitos da leucina sobre atividade enzimática de enzimas de degradação

Ainda com o intuito de elucidar o papel da leucina no metabolismo proteico em miotúbulos, avaliamos também o processo proteolítico relacionado a via lisossomal, assim a atividade enzimática da catepsina B e catepsina H foi avaliada.

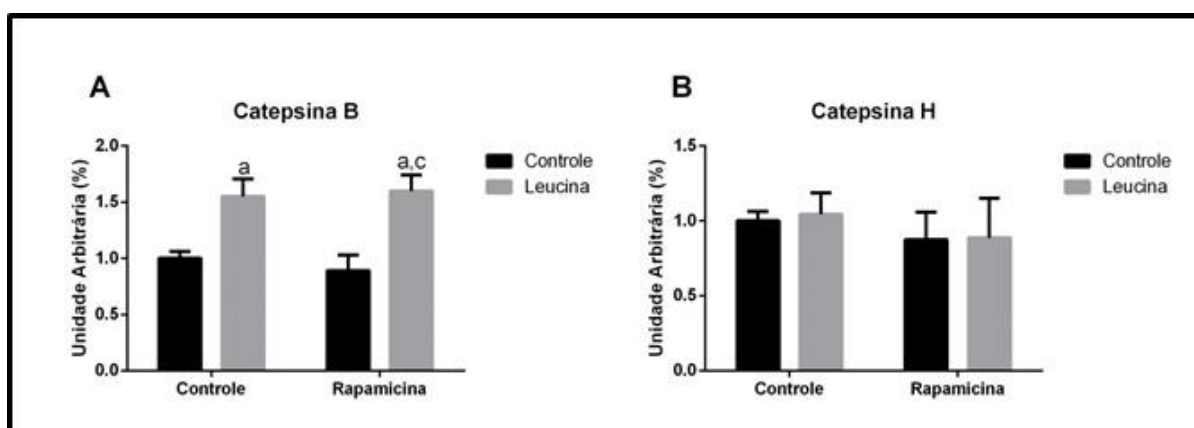


Figura 5: Atividade enzimática da via lisossomal em miotúbulos C₂C₁₂, tratados ou não com rapamicina e/ou leucina. Análise obtida por fluorescência. A) Catepsina B; B) Catepsina H. Foram realizados 2 experimentos independentes em triplicata. Para detalhes veja seção de Materiais e Métodos. Análise estatística: *two -way* Anova com pós teste Bonferroni. a: P<0,05 comparado com controle; c: P<0,05 comparado com rapamicina

Nos resultados apresentados na Figura 5, encontramos valores semelhantes quanto a atividade da catepsina H (Figura 5B), independente dos tratamentos impostos aos miotúbulos C₂C₁₂. Entretanto, encontramos aumento da atividade da catepsina B nos grupos tratados com leucina, independente da associação com rapamicina. Esses resultados sugerem que a leucina pode estar aumentando a atividade da via lisossomal nessas células, provavelmente sinalizando processos da atividade celular envolvidos com reparação e/ou diferenciação (HE et al., 2016; JU et al., 2016; SCHAPER; ROSE-JOHN, 2015). Assim, aventamos a hipótese de que o aumento da atividade lisossomal possivelmente estaria induzindo autofagia, que nesse caso poderia direcionar para a biogênese mitocondrial (JU et al., 2016).

Foi demonstrado que o exercício físico é capaz de induzir autofagia em musculo esquelético de roedores e que esse processo de autofagia estaria relacionado com a biogênese mitocondrial (JU et al., 2016). Além disso, também foi relatado que a diferenciação de mioblastos em miotúbulos depende do processo de mitofagia. Esse processo desencadeia a biogênese mitocondrial, transformando uma mitocôndria indiferenciada em mitocôndria diferenciada (SIN et al., 2016).

Novamente, com o intuito em melhor compreender o papel da suplementação nutricional com aminoácidos no desenvolvimento de miotúbulos, Kornasio e colaboradores demonstraram que o hidroximetilbutirato (HMB), o metabolito da leucina, possui influência positiva em musculo, ensaio *in vitro*, por promover diferenciação e proliferação, além de acelerar a fusão dos miotúbulos e reduzir a apoptose em cultura de mioblasto (KORNASIO et al., 2009).

Nesse sentido, acreditamos que a leucina, de forma indireta através do HMB, poderia estar aumentando a autofagia em células C₂C₁₂, com o objetivo de proporcionar a diferenciação dessas células em miotúbulos, aumentando assim a biogênese mitocondrial.

Entretanto, ao avaliar a expressão de LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) nessas amostras de miotúbulos tratados ou não com rapamicina em associação com a leucina, observamos que não houve alteração no padrão de expressão dessa proteína (Figura 6). O LC3 é conhecido por ser um marcador de autofagia celular, que em geral apresenta-se ativado no musculo quando em situação de estresse ou patologia; nesse caso, como apontado anteriormente há atrofia da massa muscular em função da diminuição da massa proteica e/ou associada a autofagia celular. Esse processo ocorre em função da reduzida ativação da AKT e, secundariamente, associado ao decréscimo do aporte energético, há elevação da AMPK, que por sua vez ativa FoxO3 com consequente degradação da massa proteica muscular, em função da ativação da via ubiquitina-proteossomo e também ativação da autofagia, via LC3 (FRITZEN et al., 2016; HERNANDEZ-GARCÍA et al., 2016; TANIDA; UENO; KOMINAMI, 2004). Em extensa revisão, Otrocka-Domagala, em 2011, aponta que há *up-regulation* dos fatores de transcrição do processo de autofagia, como FoxO3, em musculatura de indivíduos adultos, ressaltando que sua expressão é suficiente para ativar a proteólise-dependente da via lisossomal, principalmente regulada por LC3, além de outros genes relacionados à autofagia (OTROCKA-DOMAGAŁA, 2011). Nos estudos de Hernandez-Garcia e colaboradores (2016) o processo de autofagia em musculatura de suínos neonatos foi prevenida com a suplementação de leucina, principalmente pela manutenção da expressão do LC3, modulando a sua elevação em função da proteólise induzida por septicemia (HERNANDEZ-GARCÍA et al., 2016). Corroborando com esses estudos, nossos resultados mostraram que embora tenha ocorrido aumento da atividade da enzima lisossomal – catepsina B –, sugerindo aumento do processo de autofagia, contrariamente a esse processo verificamos que a leucina promoveu aumento da fosforilação do FoxO3 e consequentemente modulação desse processo. Novamente aventamos a hipótese de que a leucina pode sim ter induzido autofagia direcionando esse processo para renovação celular, garantindo a homeostasia celular, mas não para o processo de degradação proteica, com

perda celular, como o que ocorre em processos patológicos. Desse modo faz-se necessário aprofundar os estudos sobre o envolvimento da leucina em vias autofágicas e sua relação com a atividade lisossomal.

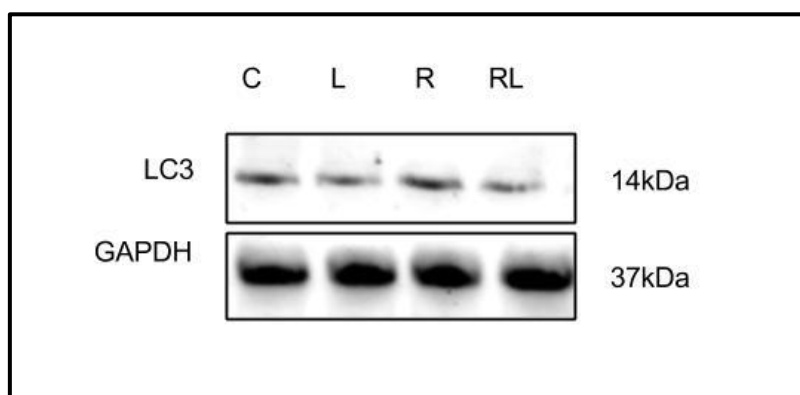


Figura 6: Expressão da proteína LC3 relacionada com o processo de autofagia analisada em miotúbulos C2C12 tratados com rapamicina e leucina. Imagem representativa de dois experimentos independentes em triplicatas e todas as amostras analisadas por Western Blot. Legenda: C=controle; L=leucina; R=rapamicina; RL=rapamicina e leucina.

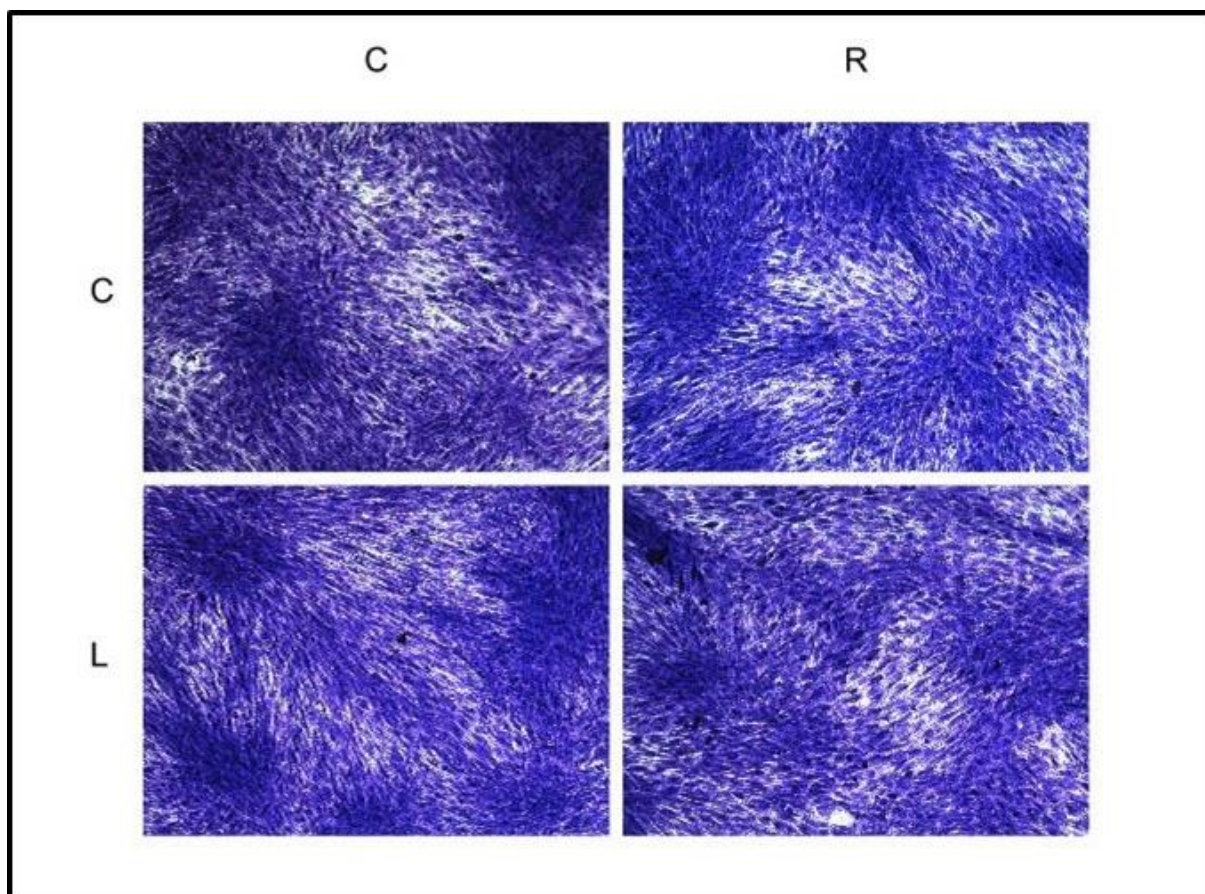


Figura 7: Imagem obtida em microscopia de luz. Miotúbulos foram tratadas com rapamicina e leucina e corados com cristal violeta. Legenda: C=controle; L=leucina; R=rapamicina; RL=rapamicina e leucina. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicatas e todas as amostras analisadas por Western Blot.

Tomando como base os resultados até então apresentados, onde verificamos que a leucina estimulou o aumento da fosforilação da p70S6K1, independente da rapamicina; e paralelamente, não houve alteração do processo de proteólise gerenciado pelo sistema ubiquitina-proteossomo, independente do aumento da atividade lisossomal, avaliado pela catepsina B, foi possível notar, como mostrado na Figura 7, que não houve alterações morfológicas nos mioblastos diferenciados em miotúbulos em nenhum dos tratamentos realizados. Concordante com esses pontos, também foi possível verificar que não houve alteração na concentração total de proteína nas amostras de miotúbulos estudados sob o tratamento com rapamicina associado à leucina (Figura 8).

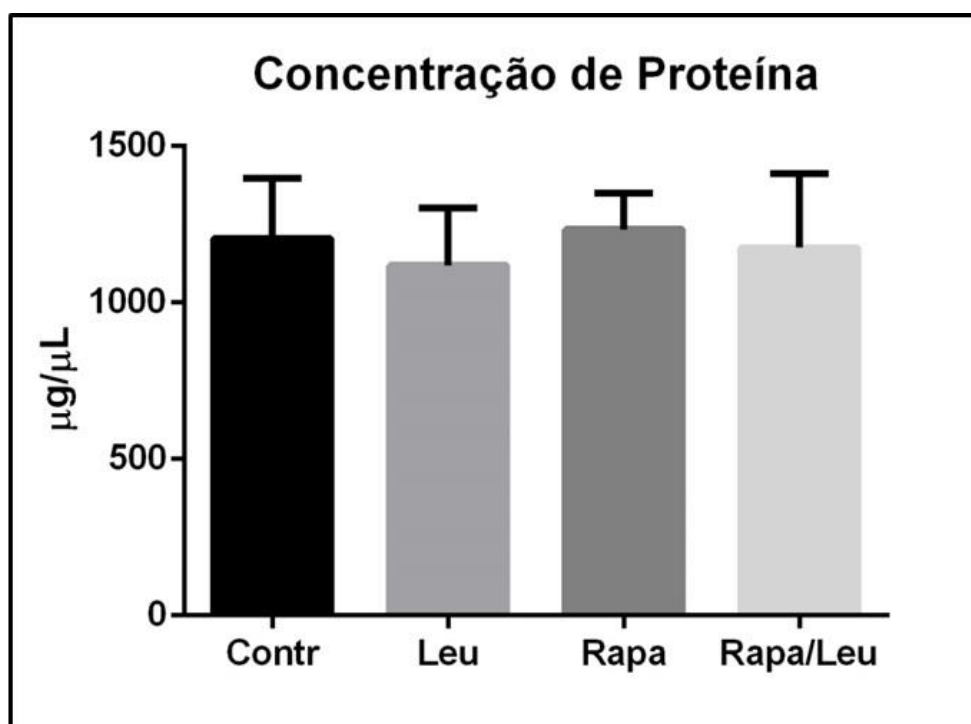


Figura 8: Concentração de proteína em miotúbulos C2C12, tratados ou não com rapamicina e associados à suplementação com leucina. Análise obtida por método colorimétrico de *Lowry*. Foram realizados 4 experimentos independentes em triplicata. Detalhes vide Materiais e Métodos.

D. Efeitos da leucina sobre o consumo de oxigênio

Como aventado inicialmente, a suplementação nutricional com leucina é capaz de modular tanto a sinalização celular, estimulando o processo de síntese proteica quanto minimizando o processo de degradação. Essa modulação parece estar associada principalmente a atividade quinase da proteína mTOR.

Para avaliar a relação entre leucina e o possível aumento da biogênese mitocondrial, foram realizados experimentos com a finalidade de medir o consumo de oxigênio nos miotúbulos C₂C₁₂. O equipamento OROBOROS foi utilizado para a determinação da respiração basal assim como a respiração na presença de moduladores da respiração celular.

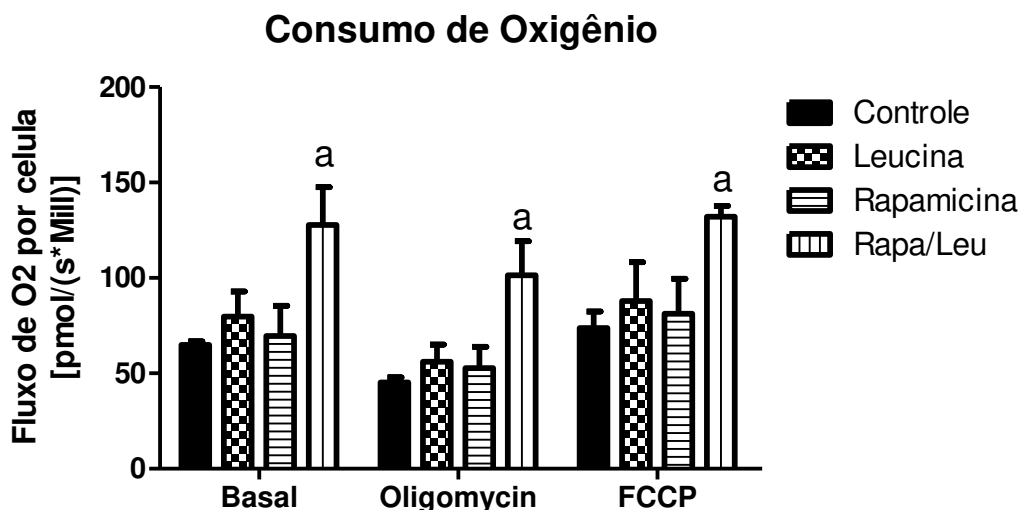


Figura 9: Consumo de oxigênio em miotúbulos C₂C₁₂, suplementados com leucina e rapamicina. Análise obtida pelo ensaio utilizando OROBOS em três situações distintas. Foram realizados 4 experimentos independentes em simplicata. Análise estatística: two-way Anova com pós-teste Bonferroni. a: P<0,05 comparado com controle

Em nossos experimentos, a leucina foi responsável por aumentar o consumo de oxigênio, tanto basal, quanto na presença de moduladores da respiração celular (oligomicina e FCCP), nos grupos previamente tratados com rapamicina (Figura 9).

O aumento do consumo de oxigênio pode estar associado a vários fatores, seja relacionado ao aumento da biogênese mitocondrial, como também diretamente envolvido com a elevação da atividade da mitocôndria, aumento na produção de energia, como também, à mudança de preferencia de substrato, já que houve maior disponibilidade de aminoácidos (leucina) no meio de cultura. Segundo Vaughan e colaboradores, o tratamento com leucina não só implica em aumento da massa muscular, por estimular a síntese proteica, como também estimula a biossíntese de novas mitocôndrias (VAUGHAN; MARTIN; LEWANDOWSKI, 2013). Os autores estudaram células rabdomiossarcoma humano, como também C₂C₁₂, e verificaram que tanto na concentração de 100μM, quanto na concentração de 500μM de leucina ambas as células aumentaram o metabolismo oxidativo basal e consumo máximo, elevando a atividade não-acopladora, bem como o aumentando o metabolismo oxidativo não mitocondrial (HE et al., 2016; VAUGHAN; MARTIN; LEWANDOWSKI, 2013) Esses estudos corroboram com os resultados aqui apresentados,

sugerindo que, por ação direta ou paralela, a leucina participa dos processos de síntese proteica associado à modulação dos processos de degradação em conjunto com a biogênese mitocondrial e/ou aumento da capacidade oxidativa celular.

VI. CONCLUSÃO

Em células de mioblastos diferenciadas em miotúbulos, tratadas ou não, com rapamicina seguida ou não de suplementação com leucina, por período agudo, obtivemos as seguintes conclusões:

1. A leucina é capaz de aumentar a fosforilação de p70S6K independentemente da presença de mTOR.
2. A rapamicina é capaz de diminuir a expressão de Smad2, sendo essa diminuição exacerbada com o tratamento associado à leucina.
3. A leucina é capaz, independente da mTOR, de ativar catepsina B, enzima relacionada com autofagia. Entretanto, não houve aumento em LC3, marcador de autofagia celular. Dessa maneira ainda não é possível explicar os efeitos da leucina sobre atividade lisossomal, pois a autofagia faz parte de importante processo de diferenciação celular, e no presente trabalho, poderia estar relacionada ao processo de regeneração e atividade em miotúbulos C₂C₁₂.
4. A leucina é capaz de modular a respiração celular, independente da associação com rapamicina, mostrando que a mTOR não está relacionada com essa modulação.

Sendo assim, estudos futuros têm como objetivo avaliar se a modulação da leucina em vias de síntese e de degradação proporcionaria a manutenção da homeostase celular, ativando vias anabólicas para obtenção de energia, como também modulando o processo de autofagia, direcionando para diferenciação e regeneração celular, bem como a biogênese mitocondrial em modelo experimental com células C₂C₁₂ diferenciadas em miotúbulos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y. et al. p90 ribosomal S6 kinase and p70 ribosomal S6 kinase link phosphorylation of the eukaryotic chaperonin containing TCP-1 to growth factor, insulin, and nutrient signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 22, p. 14939–14948, 2009.

AMTHOR, H. et al. Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. **Developmental Biology**, v. 270, n. 1, p. 19–30, 2004.

ANTHONY, J. C. et al. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 10, p. 2413–2419, 2000.

ANTHONY, J. C. et al. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **J. Nutr**, v. 131, n. 3, p. 856S–860S, 2001.

ANTHONY, J. C. et al. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 282, n. 5, p. E1092–E1101, 2002a.

ANTHONY, J. C. et al. Orally administered leucine enhances protein synthesis in skeletal muscle of diabetic rats in the absence of increases in 4E-BP1 or S6K1 phosphorylation. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 928–936, 2002b.

ARETA, J. L. et al. Increasing leucine concentration stimulates mechanistic target of rapamycin signaling and cell growth in C2C12 skeletal muscle cells. **Nutrition Research**, v. 34, n. 11, p. 1000–1007, 2014.

ARGILÉS, J. M. et al. Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan Crosstalk: Roles in Health and Disease. **Journal of the American Medical Directors Association**, 2016.

BLOUET, C.; ONO, H.; SCHWARTZ, G. J. Mediobasal Hypothalamic p70 S6 Kinase 1 Modulates the Control of Energy Homeostasis. **Cell Metabolism**, v. 8, n. 6, p. 459–467, 2008.

CASPERSON, S. L. et al. Leucine supplementation chronically improves muscle protein synthesis in older adults consuming the RDA for protein. **Clinical Nutrition**, v. 31, n. 4, p. 512–519, 2012.

CHEN, X. et al. MicroRNA-27a is induced by leucine and contributes to leucine-induced proliferation promotion in C2C12 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 14076–14084, 2013.

CHOU, M. M.; BLENIS, J. The 70 kDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. **Cell**, v. 85, n. 4, p. 573–583, 1996.

COFFEY, V. G. et al. Nutrient provision increases signalling and protein synthesis in human skeletal muscle after repeated sprints. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 7, p. 1473–1483, 2011.

COMBARET, L. et al. USP19 is a ubiquitin-specific protease regulated in rat skeletal muscle during catabolic states. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 288, n. 4, p. E693–700, 2005.

CROZIER, S. J. et al. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 3, p. 376–382, 2005.

DAGON, Y. et al. P70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 1, p. 104–112, 2012.

DENNIS, M. D.; JEFFERSON, L. S.; KIMBALL, S. R. Role of p70S6K1-mediated phosphorylation of eIF4B and PDCD4 proteins in the regulation of protein synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 51, p. 42890–42899, 2012.

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. **The Lancet Oncology**, v.12, n.5,p.489-495, 2011.

FEARON, K. C. H. et al. Effect of a protein and energy dense N-3 fatty acid enriched oral supplement on loss of weight and lean tissue in cancer cachexia: a randomised double blind trial. **Gut**, v. 52, n. 10, p. 1479–86, 2003.

FEARON, K. C. H. et al. Double-blind, placebo-controlled, randomized study of eicosapentaenoic acid diester in patients with cancer cachexia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 21, p. 3401–3407, 2006.

FEARON, K. C. H. Cancer cachexia: Developing multimodal therapy for a multidimensional problem. **European Journal of Cancer**, v. 44, n. 8, p. 1124–1132, 2008.

FRITZEN, A. M. et al. Role of AMPK in regulation of LC3 lipidation as a marker of autophagy in skeletal muscle. **Cellular Signalling**, v. 28, n. 6, p. 663–674, jun. 2016.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. **Calcified tissue international**, v. 96, n. 3, p. 183–195, 2015.

GAO, Y.; YUAN, C. Y.; YUAN, W. Will targeting PI3K/Akt/mTOR signaling work in hematopoietic malignancies? **Stem Cell Investigation**, v. 3, p. 31–31, 2016.

GIRÓN, M. D. et al. Conversion of leucine to β -hydroxy- β -methylbutyrate by α -keto isocaproate dioxygenase is required for a potent stimulation of protein synthesis in L6

rat myotubes. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 1, n. May 2015, p. 68–78, 2016.

GOODMAN, C. A. et al. Smad3 Induces Atrogin-1, Inhibits mTOR and Protein Synthesis, and Promotes Muscle Atrophy In Vivo. **Molecular Endocrinology**, v. 27, n. November 2013, p. 1946–1957, 2013.

HARA, K. et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 177–189, 2002.

HARADA, H. et al. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 17, p. 9666–70, 2001.

HE, X. et al. β -Hydroxy- β -methylbutyrate, mitochondrial biogenesis, and skeletal muscle health. **Amino Acids**, v. 48, n. 3, p. 653–664, 2016.

HERNANDEZ-GARCÍA, A. D. et al. Leucine supplementation stimulates protein synthesis and reduces degradation signal activation in muscle of newborn pigs during acute endotoxemia. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 311, n. 4, p. E791–E801, out. 2016.

HOLECEK, M. Effect of starvation on branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase activity in rat heart and skeletal muscle. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 50, n. 1, p. 19–24, 2001.

HOLECEK, M. Relation between glutamine, branched-chain amino acids, and protein metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 2, p. 130–133, 2002.

HOLECEK, M. Muscle wasting in animal models of severe illness. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, n. 3, p. 157–171, 2012.

HOLECEK, M.; KOVARIK, M. Alterations in protein metabolism and amino acid concentrations in rats fed by a high-protein (casein-enriched) diet - Effect of starvation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 12, p. 3336–3342, 2011.

HONG, S. et al. Cross-talk between Sirtuin and Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Signaling in the Regulation of S6 Kinase 1 (S6K1) Phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 19, p. 13132–13141, 9 maio 2014.

HULMI, J. J. et al. Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 106, n. 5, p. 1720–9, 2009.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: Are neuropeptides the key?. **Cancer Research**, v. 59, n. 18, p. 4493–4501, 1999.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 52, n. November 1950, p. 72–91, 2002.

IP, C. K. M. et al. p70 S6 kinase in the control of actin cytoskeleton dynamics and directed migration of ovarian cancer cells. **Oncogene**, v. 30, n. 21, p. 2420–2432, 2011.

JEWELL, J. L.; RUSSELL, R. C.; GUAN, K.-L. Amino acid signalling upstream of mTOR. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 3, p. 133–9, 2013.

JU, J. SUN et al. Autophagy plays a role in skeletal muscle mitochondrial biogenesis in an endurance exercise-trained condition. **Journal of Physiological Sciences**, v. 66, n. 5, p. 417–430, 2016.

KIM, D.-H. et al. mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 163–175, 2002.

KIM, S. Y. et al. S6K1 negatively regulates TAK1 activity in the toll-like receptor signaling pathway. **Molecular and cellular biology**, v. 34, n. 3, p. 510–21, 2014.

KIMBALL, S. R. et al. Assessment of biomarkers of protein anabolism in skeletal muscle during the life span of the rat: sarcopenia despite elevated protein synthesis. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 287, p. E772–E780, 2004.

KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 1 Suppl, p. 227S–31S, 2006.

KORNASIO, R. et al. β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) stimulates myogenic cell proliferation, differentiation and survival via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 5, p. 755–763, maio 2009.

LAI, K. P. et al. S6K1 is a multifaceted regulator of Mdm2 that connects nutrient status and DNA damage response. **The EMBO journal**, v. 29, n. 17, p. 2994–3006, 2010.

LIWAK, U. et al. Tumor Suppressor PDCD4 Represses Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation of Antiapoptotic Proteins and Is Regulated by S6 Kinase 2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 10, p. 1818–1829, 2012.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

MAGNUSON, B.; EKIM, B.; FINGAR, D. C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. **Biochemical Journal**, v. 441, n. 1, p. 1–21, 2012.

MARINO, F. E.; RISBRIDGER, G.; GOLD, E. Re-evaluating the role of activin- β C in cancer biology. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 4, p. 463–470, 2015.

MCCROSKERY, S. et al. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. **Journal of Cell Biology**, v. 162, n. 6, p. 1135–1147, 2003.

MCCROSKERY, S. et al. Improved muscle healing through enhanced regeneration and reduced fibrosis in myostatin-null mice. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 15, p. 3531–3541, 2005.

MCPHERRON, A. C.; LAWLER, A. M.; LEE, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, v.386, n. 6628, p83-90, 1997.

MILNE, A. C. et al. Protein and energy supplementation in elderly people at risk from malnutrition. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.2, 2009.

MOBLEY, C. B. et al. L-leucine, beta-hydroxy-beta-methylbutyric acid (HMB) and creatine monohydrate prevent myostatin-induced Akirin-1/Mighty mRNA down-regulation and myotube atrophy. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 38, 2014.

NARAYANAN, U. et al. S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 27, p. 18478–18482, 2008.

NOBUKUNI, T. et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 14238–14243, 2005.

OTROCKA-DOMAGAŁA, I. Sensitivity of skeletal muscle to pro-apoptotic factors. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 14, n. 4, p. 683–94, 2011.

PROUD, C. G. Amino acids and mTOR signalling in anabolic function. **Biochemical Society transactions**, v. 35, n. Pt 5, p. 1187–1190, 2007.

PROUD, C. G. mTORC1 signalling and mRNA translation. **Biochemical Society transactions**, v. 37, n. Pt 1, p. 227–231, 2009.

PROUD, C. G. **A New Link in the Chain from Amino Acids to mTORC1 Activation** *Molecular Cell*, 2011.

PROUD, C. G. mTORC1 regulates the efficiency and cellular capacity for protein synthesis. **Biochemical Society transactions**, v. 41, n. 4, p. 923–6, 2013.

RICHARDSON, C. J. et al. SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control. **Current biology : CB**, v. 14, n. 17, p. 1540–9, 7 set. 2004.

RÍOS, R. et al. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 282, n. 5, p. C993–C999, 2002.

RUSSELL, S. T. et al. Attenuation of skeletal muscle atrophy in cancer cachexia by d-myo-inositol 1,2,6-triphosphate. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 517–527, 2009.

RUSSELL, S. T.; TISDALE, M. J. Effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on expression of a lipid mobilizing factor in adipose tissue in cancer cachexia. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 72, n. 6, p. 409–414, 2005.

SANCAK, Y. et al. PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. **Molecular Cell**, v. 25, n. 6, p. 903–915, 2007.

SANCHEZ, A. M. J. et al. Autophagy is essential to support skeletal muscle plasticity in response to endurance exercise. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 307, n. 8, p. R956–69, 2014.

SANDRI, M. Protein Breakdown in Cancer Cachexia. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 2015.

SARTORI, R. et al. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 296, n. April 2009, p. C1248–C1257, 2009.

SATO, T. et al. Specific Activation of mTORC1 by Rheb G-protein in Vitro Involves Enhanced Recruitment of Its Substrate Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 19, p. 12783–12791, 2009.

SAUCEDO, L. J. et al. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. **Nature cell biology**, v. 5, n. 6, p. 566–571, 2003.

SCHAPER, F.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 5, p. 475–487, out. 2015.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447–1531, 2011.

SENGUPTA, S.; PETERSON, T. R.; SABATINI, D. M. Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 310–322, 2010.

SHAH, O. J. et al. 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. **AJPEM**, v. 279, n. 4, p. E715–E729, 2000.

SHAH, O. J.; HUNTER, T. Turnover of the active fraction of IRS1 involves raptor-mTOR- and S6K1-dependent serine phosphorylation in cell culture models of tuberous

- sclerosis. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 17, p. 6425–34, 2006.
- SHAW, R. J.; CANTLEY, L. C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 424–430, 2006.
- SHRAYYEF, M. Z.; GERICH, J. E. Normal glucose homeostasis. In: **Principles of Diabetes Mellitus**. [s.l: s.n.]. p. 19–35.
- SIN, J. et al. Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. **Autophagy**, v. 12, n. 2, p. 369–380, 2016.
- STIPANUK, M. H. Leucine and protein synthesis: mTOR and beyond. **Nutrition reviews**, v. 65, n. March, p. 122–129, 2007.
- STOCKER, H. et al. Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila. **Nature cell biology**, v. 5, n. 6, p. 559–565, 2003.
- TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 12, p. 2503–2518, dez. 2004.
- TAVARES, M. R. et al. The S6K protein family in health and disease. **Life Sciences**, v. 131, p. 1–10, 2015.
- TAYLOR, W. E. et al. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 280, p. E221–E228, 2001.
- TISDALE, M. J. Wasting in cancer. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 1S Suppl, p. 243S–246S, 1999.
- TISDALE, M. J. **Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia** Nutrition. **Anais...**2000
- TISDALE, M. J. Loss of skeletal muscle in cancer: biochemical mechanisms. **Frontiers in bioscience**, v. 6, n. 2, p. D164–74, 2001.
- TISDALE, M. J. Cancer cachexia. **Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie**, v. 389, n. 4, p. 299–305, 2004.
- TISDALE, M. J. Molecular Pathways Leading to Cancer Cachexia. **Physiology**, v. 20, n. 5, p. 340–348, 2005.
- TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiological reviews**, v. 89, n. 2, p. 381–410, 2009.
- TISDALE, M. J. Cancer cachexia. **Current opinion in gastroenterology**, v. 26, n. 2, p. 146–51, 2010.

TOLEDO, M. et al. A multifactorial anti-cachectic approach for cancer cachexia in a rat model undergoing chemotherapy. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 7, n. 1, p. 48–59, mar. 2016.

UM, S. H. et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. **Nature**, v. 431, n. 7005, p. 200–205, 2004.

VAUGHAN, V. C.; MARTIN, P.; LEWANDOWSKI, P. A. Cancer cachexia: impact, mechanisms and emerging treatments. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 4, n. 2, p. 95–109, jun. 2013.

VERHOEVEN, S. et al. Long-term leucine supplementation does not increase muscle mass or strength in healthy elderly men. **The American journal of clinical nutrition**, v. 89, n. 5, p. 1468–75, 2009.

VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: Facts and numbers. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2010.

WAGNER, K. R. et al. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. **Annals of Neurology**, v. 52, n. 6, p. 832–836, 2002.

WANG, X.; PROUD, C. G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 21, p. 362–9, 2006.

WANG, X.; PROUD, C. G. Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator. **Trends in Cell Biology**, v. 19, n. 6, p. 260–267, 2009.

WENG, Q. P. et al. Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific antiphosphopeptide antibodies. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 26, p. 16621–16629, 1998.

WHITTEMORE, L. A. et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 300, n. 4, p. 965–971, 2003.

WOLFE, R. R. **The underappreciated role of muscle in health and disease** *American Journal of Clinical Nutrition*, 2006.

XU, M. et al. The α -Ketoisocaproate Catabolism in Human and Rat Livers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, n. 3, p. 1080–1084, out. 2000.

YANG, Q.; GUAN, K.-L. Expanding mTOR signaling. **Cell Research**, v. 17, n. 8, p. 666–681, 2007.

YU, J. S. L. et al. PI3K/mTORC2 regulates TGF- β /Activin signalling by modulating Smad2/3 activity via linker phosphorylation. **Nature Communications**, v. 6, n. May, p.

1–12, 2015.

ZHOU, X. et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. **Cell**, v. 142, n. 4, p. 531–543, 2010.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 1, p. 21–35, 2011.

VIII. ANEXOS



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "*Efeitos da leucina sobre a via da mTOR e da miostatina em cultura celular de miotúbulos*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Bianca Cristine Favero
Nome do(a) aluno(a): Bianca Cristine Favero

Assinatura: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes
Nome do(a) orientador(a): Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Data: 20/09/2016

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Efeitos da leucina sobre a via da mTOR e da miostatina em cultura celular de miotúbulos**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 26 de abril de 2017

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Bianca Cristine Favero**
RG n.º 47.099.636-5

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes**
RG n.º 10153517