



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**MECANISMOS INTRACELULARES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA ANTI-
PROTEOLÍTICA DA ESTIMULAÇÃO OCITOCINÉRGICA EM MÚSCULOS
ESQUELÉTICOS DE RATAS**

TATIANE DE OLIVEIRA SANTOS

SÃO CRISTÓVÃO

2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**MECANISMOS INTRACELULARES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA ANTI-
PROTEOLÍTICA DA ESTIMULAÇÃO OCITOCINÉRGICA EM MÚSCULOS
ESQUELÉTICOS DE RATAS**

TATIANE DE OLIVEIRA SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Lustrino Borges

SÃO CRISTÓVÃO

2023

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237m Santos, Tatiane de Oliveira
Mecanismos intracelulares envolvidos na resposta anti-
proteolítica da estimulação ocitocinérgica em músculos
esqueléticos de ratas / Tatiane de Oliveira Santos ; orientador
Danilo Lustrino Borges.– São Cristóvão, SE, 2023.
56 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –
Universidade Federal de Sergipe, 2023.

1. Músculos esqueléticos. 2. Ocitocina. 3. Proteólise. I. Borges,
Danilo Lustrino, orient. II. Título.

CDU 612:616.74

TATIANE DE OLIVEIRA SANTOS

**MECANISMOS INTRACELULARES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA ANTI-
PROTEOLÍTICA DA ESTIMULAÇÃO OCITOCINÉRGICA EM MÚSCULOS
ESQUELÉTICOS DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe comorequisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Lustrino Borges (DFS/CCBS/UFS)

Dra. Silvia de Paula Gomes (DECBI, UFOP)

Dra. Natalia Lautherbach Ennes da Silva (FMRP, USP)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a Deus por conduzir a minha vida até a conclusão deste feito. À minha família e amigos pelo incentivo para que eu sempre lutasse pelos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço imensamente a Deus pela sua bondade, amor e misericórdia por ter me conduzido até a realização dos meus sonhos. Te agradeço Pai pelo dom da vida, pela graça de acordar todas as manhãs com ar para respirar, alimento, moradia, saúde e sabedoria para caminhar em busca de todos os propósitos a mim disponibilizados.

Ao meu orientador Dr. Danilo Lustrino por ter me ofertado estudar fisiologia na turma de medicina da UFS como ouvinte, a fim de que eu pudesse possuir os conhecimentos necessários para a prova de seleção do programa; e ter aceitado ser meu orientador. Obrigada por cada ensinamento transmitido, conversas, momentos alegres no laboratório, nos almoços entre um experimento e outro. Tenho muita gratidão a ti por ser um verdadeiro amigo nas horas que mais precisei desabafar sobre a vida, pelos conselhos maduros quando eu realmente precisava escutar. Acredito muito que “Cada um que passa em nossa vida, leva um pouco de nós mesmos, e deixa um pouco de si. Há os que levam muito e há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada”. Além de te agradecer por acreditar em mim, gostaria de te desejar tudo de melhor nesta vida e que Deus te abençoe na mesma proporção que você ajuda os alunos a se tornarem ótimos profissionais.

Aos meus pais, em especial à minha mãe Neide Rodrigues por me estimular a estudar e a seguir em busca dos meus sonhos, mesmo quando tudo parecia difícil aos meus olhos. Obrigada por ouvir os meus desabafos diários, porque eu sempre tinha algo do dia para compartilhar com alguém que pudesse me ouvir e a senhora sempre esteve disponível para isso, mesmo quando o sono te consumia, sempre havia um esforço máximo para estar acordada para me ouvir, risos. Sou muito grata por isso! Ao meu pai, Edivaldo Oliveira por aceitar as minhas escolhas estudantis, pelos hinos tocados no seu som em casa, sempre que eu estava na correria diária, saiba que eles me ajudaram a superar muitos desafios, obrigada por me fazer dar uma pausa enquanto estudava, apenas para comer alguma carne deliciosa que o senhor preparava. Sou imensamente grata aos senhores pela educação material e espiritual a qual me proporcionaram, por cada ajuda mesmo que tenha superficialmente sido para vocês algo mínimo, para mim foi algo que me manteve de pé em busca da realização de meus sonhos. Agradeço desde o apoio financeiro ao emocional, pois foram cruciais para que eu pudesse me tornar quem sou hoje. Amo vocês

infinitamente!

À minha avó materna Helena (*in memoriam*) a qual a perdi recentemente, a senhora foi o meu suporte espiritual para poder chegar até aqui, sou muito grata por todos os conselhos e ombro amigo quando mais precisei. A sua preocupação quando me encontrava na madrugada estudando, cada forma de carinho me motivava a buscar meus sonhos a cada dia. Ao meu avô materno, Júlio (*in memoriam*) sou grata pelo carinho e por sempre dizer que oraria por mim.

À minha avó paterna Altair (*in memoriam*), por sempre me transmitir amor desde muito pequena e uma forma linda de me mostrar que mesmo sendo paraplégica seria possível sorrir.

Ao meu irmão, Tiago Oliveira pelo apoio durante meus estudos e por sempre acreditar em mim. À minha cunhada Marlina pelo carinho e palavra amiga quando precisei. Deus vos abençoe imensamente!

À minha família paterna, com carinho especial às minhas tias Sueli, Gilvaneide, Gilvanete e Edvânia, aos meus tios Dogeval e Digenal. À família materna, meus tios Elias e Julio pela atenção e carinho.

Às minhas primas Sacha Rosário, que mesmo morando nos EUA sempre me transmitiu bons conselhos para eu continuar firme nos meus estudos. Ester Epaminondas, que mesmo tão nova na idade se apresentou tão madura para me orientar em alguns momentos da vida, obrigada prima pelo seu carinho. Sou agradecida pelo carinho que sempre recebi das minhas primas Mariane, Iacha, Daniela, Andrea, Suzi, Marcia, Lívia e Lais.

Aos meus primos, Alan Oliveira pela sua amizade, apoio nos estudos e na vida. Sou grata a você por ter me dado estímulo para realizar mestrado com o professor Danilo e orientações para a minha apresentação de seleção. Você é o meu exemplo de pessoa batalhadora e estudiosa da vida acadêmica. Obrigada por tudo! A João e Anderson pelas brincadeiras e carinho de sempre. A Márcio, pelas palavras amigas. Aos primos Moisés, Marcelo, Marcos, Deivid, Ismael, Jorgeval e Denisval pela alegria ao se dirigir a mim para conversar, mesmo que por alguns instantes.

À minha amiga Lorena, que desde o ensino médio na escola tem sido a minha irmã. Obrigada por ter me escutado, aconselhado e estimulado a sempre persistir em busca de meus objetivos em meio aos desafios da vida. Você tem sido um anjo na minha vida. Deus abençoe a Arthur, meu sobrinho do coração e a seu esposo Roberto pelas palavras abençoadas no momento certo. Amo vocês!

Às minhas amigas da escola Luciana, Juliane, Brenda, Graciele, Bruna, Danielle, Ingrid pelo carinho e amizade continuamente. Obrigada, meninas!

Aos amigos que a graduação me proporcionou Fabiana, Suzana, Renata, Rodolfo e Daiane pelo carinho. Queridos, vocês são “como ondas do mar: umas vezes estão longe por força das circunstâncias, outras estão perto e inundam nossa alma de alegria. Não importa a distância que nos separam, pois garantidamente elas sempre nos fazem perceber que sua presença será eterna.”

À mocidade, irmandade e ministério do Jardim Centenário, os quais foram a minha alegria quando estive sobrecarregada de tarefas dos estudos. Em especial Edvânia, Yara Letícia, Letícia, Wolney, Layane, Vinícios, Yan e Matheus pela irmandade. Vocês são especiais!

Aos meus amigos brasileiros que a Argentina me presenteou, em especial a Rodrigo Renovato pela ajuda nos momentos de estudos, suporte emocional e espiritual diário; a Ramón Cruz pela irmandade e palavras de incentivo durante esta caminhada; à Renata pelo carinho, Gustavo pelas palavras guiadas por Deus e toda irmandade que sempre oram por mim.

À minha amiga, Raquel Prado pela sua amizade, paciência e conselhos durante a minha caminhada desde o Conservatório de Música de Sergipe, depois na graduação e posteriormente no mestrado na UFS. Sou infinitamente grata a você por segurar a minha mão quando não havia em mim mais forças para seguir. Acredito que você foi um anjo que Deus colocou na minha vida no momento certo. A sua presença em esta trajetória foi crucial para a realização deste sonho. Que honra ter vivenciado momentos de pesquisa contigo e poder contemplar a sua vitória no mestrado! Gratidão a você e à sua mãe Maria Antônia por todo carinho a mim proporcionado.

Ao meu amigo, Enrique Cardoso pela alegria e compartilhamento de momentos felizes durante a sua iniciação científica no laboratório. Obrigada por toda ajuda e parceria durante os experimentos na UFS.

Ao aluno de iniciação científica Lucas Chagas pela parceria e ajuda durante meus experimentos e momentos de aprendizado. Aos colegas de pesquisa no laboratório João Cruz por toda ajuda nos experimentos, sermões e brincadeiras durante essa jornada; Daniely Messias pela disponibilidade em auxiliar na execução dos meus experimentos e pelas conversas durante os dias de pesquisa. Gratidão a vocês por todo apoio ofertado.

Ao professor Drº Daniel Badauê Passos Jr pela atenção, educação e oferta

de conhecimento durante o período em que fui ouvinte da sua turma de fisiologia na UFS. Gratidão pela disponibilidade do Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental para a realização dos experimentos.

A professora Dr^a Veridiana Moreira pelo carinho, disposição para me ensinar e ofertar materiais de estudos durante o período em que fui ouvinte das suas turmas de fisiologia na UFS e durante o meu mestrado.

Ao corpo docente do programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PROCFIS) da UFS pela atenção e oferta de conhecimentos durante o meu mestrado.

A todos os pós-graduandos, em especial a Marcelo Nunes, Karina Mota, Ana Carla, Daniel Alves, Lorrany Santos, Milena Monteiro, Tanise Pires, Jileno Ferreira, José Uilien, José Leandro e Heleno por toda união. Vocês foram sensacionais!

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia, pela atenção e receptividade, em especial às funcionárias Edivânia e Ninha, ao secretário do PROCFIS, Luiz Cesar pela atenção e alegria. Aos funcionários do Biotério de Animais por cuidarem com zelo dos animais, para que realizássemos os experimentos da melhor forma possível.

Aos animais cujas vidas foram interrompidas em prol da realização desta pesquisa científica.

À Universidade Federal de Sergipe pela oportunidade que me proporcionou para realizar o mestrado.

Ao CLQM (Centro de Laboratórios de Química Multiusuários) da Universidade Federal de Sergipe pelo suporte às análises. Em especial, à Dra. Roberta Menezes pela atenção e disponibilidade para ofertar o espaço.

À Professora Dr^a Roberta Pereira Miranda Fernandes por disponibilizar o Laboratório de Enzimologia da UFS durante as pesquisas. Em especial, a doutoranda Tamiris Carvalho e a sua equipe de laboratório pelo carinho, atenção e confiança em disponibilizar o laboratório para a utilização de alguns equipamentos para a realização dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsa de estudos.

"Como águas profundas é o propósito no coração do homem; mas o homem inteligente o descobrirá."

(Provérbios 20:5)

RESUMO

MECANISMOS INTRACELULARES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA ANTI-PROTEOLÍTICA DA ESTIMULAÇÃO OCITOCINÉRGICA EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE RATAS. Tatiane de Oliveira Santos, Mestrado em Ciências Fisiológicas, UFS, São Cristóvão/SE, 2023. Embora tenha sido previamente demonstrado que a estimulação de receptores para ocitocina (OT) possa controlar a massa muscular esquelética *in vitro* e *in vivo*, os mecanismos intracelulares que medeiam este efeito ainda são pouco conhecidos. Desta forma, músculos esqueléticos oxidativos de ratas foram isolados e incubados com OT, com um agonista seletivo não-peptídico (WAY-267,464) e com um antagonista (atosiban) dos receptores para OT (OTR) e taxa de degradação proteica foi avaliada. Os resultados indicaram que tanto a OT como o WAY-267,464 (WAY) atenuaram a proteólise muscular e este efeito foi bloqueado pela adição do atosiban no meio de incubação. Além disso, observou-se que a ação anti-catabólica no metabolismo de proteínas musculares produzida pelo WAY é independente do acoplamento entre o OTR e a proteína G α i, uma vez que ela foi insensível à toxina *pertussis* (PTX). Por outro lado, a inibição dos receptores para inositol trifosfato (IP3R), os quais medeiam o efluxo de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático para o citoplasma, completamente bloqueou o aumento no conteúdo de substratos fosforilados pela proteína quinase dependente de Ca²⁺ (PKC), na fosforilação da Akt e FoxO1 e consequentemente, na diminuição de LC3 (um marcador da proteólise autofágica/lisossomal) e da proteólise total induzido pelo WAY. Resultados similares foram obtidos em músculos incubados na presença de WAY e da triciribina, um inibidor da Akt. Em conjunto, estes dados indicam que o OTR produz seus efeitos anti-catabólicos no metabolismo de proteínas musculoesqueléticas, através de sua interação com a via G α q induzindo aumento na concentração de Ca²⁺ via IP3R e de uma sinalização intracelular cruzada com a Akt, a qual fosforila e inibe FoxO1 o que consequentemente diminuirá a expressão de genes relacionados à atrofia, como o LC3 e a proteólise muscular.

DESCRIPTORIOS – Ocitocina; receptor para ocitocina; músculo esquelético; proteólise; Akt/FoxO/LC3.

ABSTRACT

INTRACELLULAR MECHANISMS INVOLVED IN OXYTOCIN RECEPTOR-INDUCED ANTIPROTEOLYTIC EFFECTS IN RAT SKELETAL MUSCLE. Tatiane de Oliveira Santos, Mestrado em Ciências Fisiológicas, UFS, São Cristóvão/SE, 2023. Although it has been previously demonstrated that the stimulation of oxytocin (OT) receptors can control skeletal muscle mass *in vitro* and *in vivo*, the intracellular mechanisms that mediate this effect are still poorly understood. Thus, oxidative skeletal muscles of rats were isolated and incubated with i) OT, ii) a non-peptide selective agonist (WAY-267,464), and iii) an antagonist (atosiban) of OT receptors (OTR), and overall proteolysis was evaluated. The results indicated that both OT and WAY-267,464 (WAY) attenuated muscle proteolysis, and this effect was blocked by the addition of atosiban. Furthermore, it was observed that the WAY-induced anti-catabolic action on protein metabolism is independent of the coupling between OTR and G α i, as it was insensitive to pertussis toxin (PTX). On the other hand, inhibition of inositol triphosphate receptors (IP3R), which mediates Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum to the cytoplasm, completely blocked the increase in the contents of Ca²⁺-dependent protein kinase (PKC) phosphorylated substrates and both Akt and FoxO1 phosphorylation, consequently leading to a decrease in LC3 (an autophagic/lysosomal marker) and total proteolysis induced by WAY. Similar results were obtained in WAY-incubated muscles in the presence of triciribine, an Akt inhibitor. Taken together, these data indicate that OTR produces skeletal muscle protein-sparing effects through a G α q/IP3R/Ca²⁺-dependent pathway and crosstalk with Akt/FoxO1 intracellular signaling, which consequently decreases the expression of genes related to atrophy, such as LC3 and muscle proteolysis.

Key words: Oxytocin; oxytocin receptor; skeletal muscle; proteolysis; Akt/FoxO/LC3.

RESUMO VOLTADO PARA A SOCIEDADE

MECANISMOS INTRACELULARES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA ANTI-PROTEOLÍTICA DA ESTIMULAÇÃO OCITOCINÉRGICA EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE RATAS. Tatiane de Oliveira Santos, Mestrado em Ciências Fisiológicas, UFS, São Cristóvão/SE, 2023. Desde a descoberta da ocitocina (OT) foi demonstrado que este hormônio é capaz de induzir a contração de células musculares no útero e na glândula mamária e assim induzindo o parto e a ejeção do leite durante a amamentação, respectivamente. Mais recentemente, descobriu-se que além do músculo presente nestes órgãos, a OT também é capaz de controlar o tamanho da massa muscular esquelética que é o tecido mais abundante no corpo de mamíferos e responsável por realizar diversas funções, como por exemplo a locomoção. Neste estudo, demonstramos que o efeito protetor da OT na massa muscular esquelética depende da ativação de proteínas específicas presentes no interior da célula que são também estimuladas pela insulina. Desta forma, é possível supor que a OT possa, futuramente, ser utilizada em abordagens clínicas objetivando impedir a diminuição da massa muscular corporal observada em diversas doenças, como por exemplo, o *diabetes mellitus*.

Palavras-Chave: Ocitocina; músculo esquelético; massa muscular.

LISTA DE ABREVIATURAS

2-APB 2-Aminoetildifenilborato

AC Adenilato ciclase

Akt Proteína quinase B ou PKB

AMPc Adenosina monofosfato cíclico

Ang 1-7 Angiotensina 1-7

ANOVA Análise de variância

ATB Atosiban

BAPTA-AM Ácido 1,2-Bis(2-aminofenoxi)etano-N, N, N', N'- tetraacético tetraquis (éster acetoximetílico)

C₂C₁₂ Mioblastos imortalizados obtidos de camundongos

CaMK Quinase dependente de cálcio-calmodulina

CEPA Comitê de Ética em Pesquisa com Animais

CREB Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico

DAG Diacilglicerol

DMSO Dimetilsulfóxido

E1 Enzima ativadora

E2 Enzima carreadora

E3 Ubiquitina ligase

EPAC Proteína trocadora ativada por AMPc

FoxO *Forkhead box O*

GPCR Receptores acoplados à proteína G

HRP *Horseradish peroxidase*

IGF-1 Fator de crescimento similar à insulina do tipo 1

IL-1b Interleucina 1b

IL-6 Interleucina 6

IP3 Inositol trifosfato

IP3R Receptores para IP3

LC3 *Microtubule-associated protein light chain 3*

LPA Ácido lisofosfatídico

MDM2 *Murine double minute 2*

MuRF1 *Muscle RING Finger – 1*

NF-κB Fator nuclear kappa B

OT Ocitocina

OTR receptores para ocitocina

PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida

PI3K Fosfatidilinositol 3-kinase

PKA Proteína quinase dependente de AMPc

PKC Proteína quinase dependente de Ca^{2+}

PLC Fosfolipase C

PMA Forbol-12-miristato-13-acetato

PTX Toxina *pertussis*

PVN Núcleo hipotalâmico paraventricular e supraótico

RIPA Tampão para ensaio de radioimunoprecipitação

RTK Receptores tirosina quinase

SDS Dodecilsulfato de sódio

SIK-1 Quinase induzida por sal do tipo 1

SON Núcleo hipotalâmico supraótico

TNF- α Fator de necrose tumoral α

Ub Ubiquitina

UFS Universidade Federal de Sergipe

UPS Sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma

V1aR Receptores para vasopressina do tipo 1a

WAY WAY-267,464

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos possíveis mecanismos intracelulares envolvidos na ação anti-proteolítica da ocitocina (OT) em músculos esqueléticos.3

Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de ocitocina (OT, em **a**), do agonista, WAY-267,464 (**b**) e antagonista dos receptores para OT, atosiban (**c**) e da co-incubação de 1,0 μ M de WAY-267,464 e 10 μ M de atosiban (**d**) na proteólise total em músculos soleus de ratas. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA) de uma via (em **a**, **b** e **c**) ou de duas vias (em **d**) seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. Controle; $^{\$}p < 0,05$ vs. 1,0 μ M de atosiban e $^{\#}p < 0,05$ vs. 1,0 μ M de WAY-267,464; $n = 5-7$ /grupo.....18

Figura 3. Efeito temporal do WAY-267,464 nos conteúdos de proteínas fosforiladas pelas proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA, em **a**), e de Ca^{2+} (PKC, em **b**), de SIK-1 (**c**) e de pSer⁴⁷³-Akt (**d**) em músculos soleus de ratas em condições basais. Imagens representativas dos blottings (**e**). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. Controle; $n = 3$ /grupo.20

Figura 4. Efeito do WAY-267,464 (1,0 μ M) e da toxina Pertussis (PTX, 100ng.mL⁻¹) na proteólise total (**a**, $n = 6$ /grupo) e no conteúdo de proteínas fosforiladas pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA, em **b**) e dos marcadores de autofagia, LC3 I e LC3 II (**c**) em músculos soleus de ratas em condições basais. Imagens representativas dos blottings (**d**). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. Controle. Em **b-d**, os resultados correspondem a 30 minutos de exposição aos agentes ($n = 3$ /grupo). 22

Figura 5. Efeito do WAY-267,464 (1,0 μ M) e do BAPTA-AM (50 μ M) na proteólise total (**a**, $n = 7$ /grupo) e no conteúdo de proteínas fosforiladas pela proteína quinase dependente de Ca^{2+} (PKC, em **b**) e dos marcadores de autofagia, LC3 I e LC3 II (**c**)

em músculos soleus de ratas em condições basais. Imagens representativas dos blottings (**d**). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. Controle; # $p < 0,05$ vs. WAY. Em **b-d**, os resultados correspondem a 30 minutos de exposição aos agentes (n=3/grupo).24

Figura 6. Efeito do WAY-267,464 (1,0 μ M) e do 2-APB (100 μ M) na proteólise total (**a**, n=8/grupo) e no conteúdo de proteínas fosforiladas pela proteína quinase dependente de Ca^{2+} (PKC, em **b**), dos marcadores de autofagia, LC3 I e LC3 II (**c**) de pSer⁴⁷³-Akt e pSer²⁵⁶-FoxO1 (**d**) em músculos soleus de ratas em condições basais. Imagens representativas dos blottings (**e**). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. Controle; # $p < 0,05$ vs. WAY. Em **b-e**, os resultados correspondem a 30 minutos de exposição aos agentes (n=3/grupo).26

Figura 7. Efeito do WAY-267,464 (1,0 μ M) e da triciribina (10 μ M) na proteólise total (**a**, n=7/grupo) e no conteúdo dos marcadores de autofagia, LC3 I e LC3 II (**b**) e de pSer⁴⁷³-Akt e pSer²⁵⁶-FoxO1 (**c**) em músculos soleus de ratas em condições basais. Imagens representativas dos blottings (**d**). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. Controle; # $p < 0,05$ vs. WAY. Em **b-d**, os resultados correspondem a 30 minutos de exposição aos agentes (n=3/grupo).28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados neste estudo.	16
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1. Sistemas proteolíticos na musculatura esquelética	3
2.2. Mecanismos intracelulares envolvidos no controle da proteólise muscular	5
2.3. Papel da ocitocina na regulação do metabolismo na musculatura esquelética	7
3. OBJETIVOS	10
3.1. Objetivo geral	10
3.2. Objetivos específicos	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1. Animais	11
4.2. Procedimentos gerais	11
4.2.1 Escolha dos animais	11
4.2.2. Delineamento experimental	12
4.2.3. Procedimento experimental para a análise da proteólise em músculos <i>soleus</i> de ratas	14
4.3. Dosagem de proteínas	15
4.4. Análise de proteínas através do western blotting	15
4.5. Análise estatística	16
5. RESULTADOS	17
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE	53
ANEXO	56

1. INTRODUÇÃO

Diversas condições patológicas estão relacionadas à perda de massa muscular como *diabetes mellitus*, insuficiência renal, câncer, síndrome de Cushing, etc. (BONALDO; SANDRI, 2013; KETTELHUT; WING; GOLDBERG, 1988). Uma característica em comum destas doenças é a ativação da proteólise que culmina com a atrofia muscular piorando o prognóstico dos pacientes (BONALDO; SANDRI, 2013; NUNES *et al.*, 2022). Embora não estejam disponíveis fármacos que controlem a proteólise muscular, diversos estudos têm demonstrado que este processo pode ser regulado por fatores neurais e hormonais, indicando que as vias intracelulares mediadas por estes sinalizadores podem ser utilizadas como alvos para prevenção e tratamento de doenças relacionadas à perda de massa muscular (CHEN *et al.*, 2022).

Neste sentido, recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que a ocitocina (OT) é capaz de inibir o catabolismo proteico em músculos *soleus* de ratas (COSTA *et al.*, 2021). Enquanto a principal fonte de OT circulante advém dos neurônios magnocelulares localizados nos núcleos hipotalâmicos paraventricular (PVN) e supraótico (SON) (ARMSTRONG, 2015; DUVIGNEAUD *et al.*, 1954), foi também demonstrado que o músculo esquelético produz OT, possui receptores para este neuropeptídeo (BRETON *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2019) e que a ação anabólica dos esteroides sexuais parece depender, pelo menos parcialmente, do aumento da sinalização ocitocinérgica em músculos esqueléticos (DEJAGER *et al.*, 2011). Adicionalmente, a incubação de um agonista seletivo não peptídico dos receptores para OT (OTR), WAY-267,464, atenuou a proteólise proteassomal e lisossomal em músculos *soleus* (COSTA *et al.*, 2021). Embora esta ação tenha sido associada com a ativação da Akt (também conhecida como PKB) e fosforilação com consequente inibição da atividade de fatores de transcrição da família FoxO (do inglês, *forkhead box O*), os mecanismos intracelulares envolvidos neste efeito ainda são pouco conhecidos.

O OTR é um membro típico da família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR) (DEING *et al.*, 2013; DEVOST; WRZAL; ZINGG, 2008). A estimulação deste receptor está classicamente associada com a ativação da proteína Gαq e da fosfolipase C (PLC), que produz diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), promovendo dessa maneira o aumento do cálcio (Ca²⁺) intracelular, o qual pode se ligar e ativar a proteína quinase dependente de Ca²⁺ (PKC) (GIMPL; FAHRENHOLZ,

2001; HYE *et al.*, 2016). De fato, a estimulação da via de sinalização mediada pela Gαq diminuiu a expressão dos marcadores do sistema proteassomal induzida pelo desuso (MORALES *et al.*, 2016) e queimadura (SHERIFF *et al.*, 2009), respectivamente, no entanto o papel da PKC não foi elucidado nestes estudos. Interessantemente, a ativação da PKC com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) foi capaz de aumentar a fosforilação da Akt (WU *et al.*, 2009), o que poderia, pelo menos parcialmente, justificar a inibição da proteólise induzida pela estimulação dos OTR observada por COSTA *et al.* (2021), no entanto se a via Gαq está envolvida nos efeitos anti-proteolíticos induzidos pela estimulação ocitocinérgica em músculos esqueléticos é uma questão em aberto.

Por outro lado, Strakova e Soloff (1997) utilizando miócitos uterinos sugeriram que o OTR pode também estar acoplado à proteína Gαi, uma vez que os efeitos da OT foram inibidos quando este tecido foi exposto à toxina *pertussis* (PTX), reconhecida por impedir a diminuição do conteúdo de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) intracelular promovida por agonistas de GPCR acoplados à Gαi. Embora o AMPc seja conhecido por inibir a proteólise muscular (BAVIERA *et al.*, 2010; NAVEGANTES *et al.*, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2014), foi também demonstrado que a superexpressão da isoforma Gαi2 estimulou a hipertrofia e diferenciação de miotubos através de uma via dependente de PKC e independente de Akt (MINETTI *et al.*, 2011).

Os resultados descritos acima indicam que o OTR pode estar acoplado à Gαq ou Gαi em diferentes tecidos, contudo qual destas vias é responsável pelo efeito anti-catabólico no metabolismo de proteínas musculares induzido pela OT ainda permanece desconhecido (**Figura 1**). Assim, o principal objetivo deste trabalho é identificar os “*mecanismos intracelulares envolvidos na resposta anti-proteolítica da estimulação ocitocinérgica em músculos esqueléticos de ratas*”.

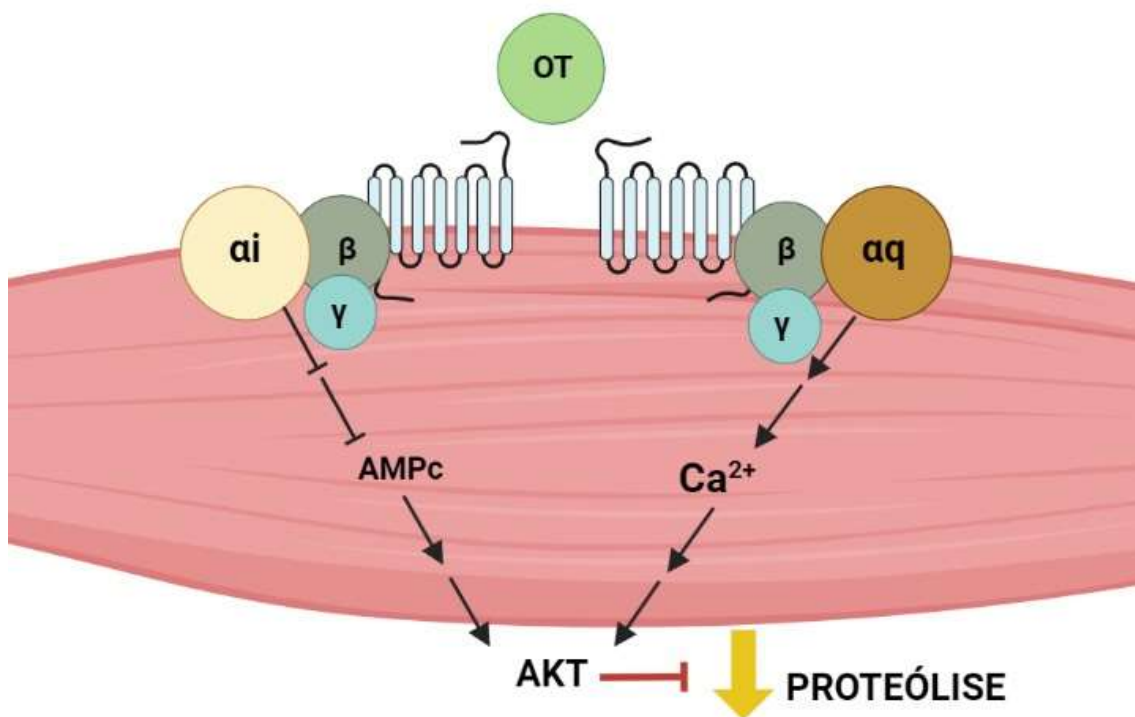


Figura 1. Representação dos possíveis mecanismos intracelulares envolvidos na ação anti-proteolítica da ocitocina (OT) em músculos esqueléticos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Sistemas proteolíticos na musculatura esquelética

A perda de massa muscular é caracterizada por atrofia, que comumente é causada por doenças renais, sepse, *diabetes*, câncer, fraturas ósseas ou alterações metabólicas (BONALDO; SANDRI, 2013). Essas condições apresentam frequentemente elevações de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1b e IL-6, como também por glicocorticoides que estimulam a ocorrência de proteólise por meio de ativação de fatores de transcrição como NF- κ B e FoxO (VAN HEES *et al.*, 2011). Sabe-se que existem pelo menos três tipos de sistemas de degradação responsáveis pelo processo de renovação de proteínas na musculatura esquelética, sendo eles: o sistema proteolítico lisossomal, dependente de Ca^{+2} e dependente de ubiquitina (Ub)-proteassoma (UPS) (BONALDO; SANDRI, 2013; SANDRI, 2012).

O sistema lisossomal, também chamado de autofagia, depende da ação coordenada entre a vesícula contendo o material a ser degradado e os lisossomos

(BONALDO; SANDRI, 2013; SANDRI, 2008; ZHAO *et al.*, 2007). Estas organelas são limitadas por membrana contendo em seu interior várias hidrolases mantidas em baixo pH. Sua função está relacionada à remoção de componentes celulares destinados a degradação, tais como outras organelas e proteínas (PALMA *et al.*, 2013). Em mamíferos, três diferentes mecanismos estão envolvidos na degradação de substratos pelos lisossomos: microautofagia, que ainda não foi descrito no músculo esquelético; autofagia mediada por chaperonas, cujo papel ainda não foi elucidado em músculos esqueléticos em situações basais ou atroficas; e, macroautofagia, que parece ser a mais importante, aqui denominado de autofagia. Este último tem início com a formação de uma vesícula limitada por membrana contendo pequenas proteínas como a LC3 (do inglês, *microtubule-associated protein light chain 3*) que são importantes para a formação do autofagossomo, e por fim, para a fusão deste com o lisossomo, permitindo que o substrato seja então degradado (BONALDO; SANDRI, 2013; PALMA *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2007). Embora os lisossomos tenham papel limitado na maior parte da proteólise intracelular, aumentos significativos no conteúdo de RNAm da catepsina L, importante cisteína protease lisossomal, foram observados no músculo de roedores sépticos, portadores de tumor, tratados com dexametasona (DEVAL *et al.*, 2001) ou mantidos sob jejum alimentar (JAGOE *et al.*, 2002).

Adicionalmente, duas isoformas das calpaínas, as proteases do sistema dependente de Ca^{2+} , foram identificadas em quantidades significativas na musculatura esquelética, a μ -calpaína e a m-calpaína, que se diferem devido à necessidade da concentração de Ca^{2+} no citosol para que elas se tornem ativas (GOLL *et al.*, 2003, 2007). Abordagens farmacológicas envolvendo a administração de agonistas β -adrenérgicos demonstraram que o efeito anti-catabólico na musculatura esquelética desenvolvido por estes agentes, é pelo menos em parte, mediado por diminuição da atividade das calpaínas e aumento da atividade das calpastatinas, inibidoras endógenas destas proteases (NAVEGANTES *et al.*, 2001; TONGE *et al.*, 2010). Ademais, Alderton e Steinhardt, (2000) demonstraram aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico em diversas condições atroficas que foram relacionadas com aumento na atividade das calpaínas.

Entretanto, em todos os tecidos, a maioria das proteínas intracelulares é degradada pelo sistema proteolítico UPS. A funcionalidade desse sistema requer ação coordenada das enzimas conhecidas como E1 (enzima ativadora) e E2 (enzima

carreadora), que preparam a ubiquitina para ligação à proteína-alvo, porém a enzima-chave é a E3 (ubiquitina ligase), pois ela reconhece a proteína-alvo e transfere a ubiquitina ativada. A proteína-alvo, então marcada com moléculas de ubiquitina é direcionada para o proteassoma 26S, onde será finalmente degradada. Este por sua vez é um complexo proteico, formado por subunidades reguladoras, 19S e catalítica, 20S, na qual estão presentes enzimas com atividade similar à quimiotripsina, tripsina e caspase (BODINE; BAEHR, 2014; VENTADOUR; ATTAIX, 2006). É estimado que cerca de 80 a 90% das proteínas celulares sejam degradadas pelo sistema proteolítico UPS, e, portanto não seria surpresa que diversas situações atroficas estejam relacionadas com o aumento da atividade desta via (BODINE *et al.*, 2001a; GOMES *et al.*, 2001). LECKER *et al.*, (1999, 2004) demonstraram haver um programa comum que culmina em atrofia do músculo esquelético em roedores, uma vez que foi observado aumento da expressão de componentes do sistema UPS em diversas condições atroficas. Estudos realizados por GOMES *et al.*, (2001) e BODINE *et al.*, (2001) identificaram a presença tecido-específica das enzimas E3 ligases, MuRF1 (do inglês, *Muscle RING Finger – 1*) e Atrogina-1, nos músculos esquelético e cardíaco, e observaram que o RNAm destas enzimas é suprarregulado em condições atroficas como a desnervação, imobilização, jejum, uremia e *diabetes*. Por tudo, atualmente estas duas enzimas são utilizadas como marcadores da atividade do UPS.

O que fica até aqui evidente, é que embora uma variedade de estímulos induza atrofia muscular, há um número surpreendente de semelhanças nas respostas intracelulares. Portanto a compreensão das vias de sinalização intracelulares que regulam a massa muscular e os sinais que produzem mudanças nestes processos durante diferentes tipos de indução de proteólise deve oferecer *insights* sobre a coordenação das respostas celulares.

2.2. Mecanismos intracelulares envolvidos no controle da proteólise muscular

Está bem estabelecido que hormônios anti-catabólicos clássicos como a insulina e o IGF-1 (Fator de crescimento similar à insulina do tipo 1) promovem aumento de massa muscular, pelo menos em parte, através da Akt que por meio da fosforilação nos resíduos serina⁴⁷³ e treonina³⁰⁸ resulta em sua ativação enzimática e consequente supressão da degradação de proteínas, principalmente pela fosforilação de fatores de transcrição da família FoxO (BODINE *et al.*, 2001b; GLASS, 2003; ZHAO

et al., 2007). Adicionalmente, a Akt também pode fosforilar a enzima E3 ligase, mdm2 (do inglês, *murine double minute 2*) (OGAWARA *et al.*, 2002) que ubiquitinará FoxO predispondo-o a degradação pelo proteassoma (BERTAGGIA; COLETTI; SANDRI, 2012). Os membros da família de FoxO são os principais responsáveis pela transcrição gênica da atrogina-1, MuRF1, LC3 e outros **atrogenes** que fazem parte do “programa atrófico”. Durante o crescimento muscular, a atividade de FoxO é inibida pela fosforilação induzida pela Akt enquanto, em situações catabólicas, sua atividade é estimulada pela defosforilação. A ativação de FoxO promove sua translocação nuclear e ativação da transcrição do gene da atrogina-1, MuRF1 e LC3, dando início assim à estimulação da degradação de proteínas pelos sistemas proteassomal e lisossomal, respectivamente, e à perda da massa muscular esquelética (BERTAGGIA; COLETTI; SANDRI, 2012; EBERT *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2007). Desta forma, a Akt é considerada uma proteína chave no controle do metabolismo proteico (BODINE *et al.*, 2001b; GLASS, 2003).

Diversos estudos tem demonstrado que independente da estimulação de receptores tirosina quinase (RTK) que classicamente ativam a via de sinalização da Akt, os GPCR podem realizar sinalizações intracelulares cruzadas com esta quinase e diminuir a proteólise muscular (BAVIERA *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2009; GRACA *et al.*, 2013; LAUTHERBACH *et al.*, 2022). Por exemplo, MORALES *et al.* (2016) observaram que a angiotensina 1-7 (Ang 1-7) aumentou a fosforilação da Akt e atenuou a perda de massa muscular e a superexpressão de atrogina-1 e MuRF-1 induzida pela imobilização. Interessantemente, os efeitos da Ang 1-7 foram dependentes de receptores MAS, os quais são GPCR classicamente acoplados à Gαq (SANTOS *et al.*, 2003), já que eles não foram observados em animais nocautes para este receptor (MORALES *et al.*, 2016). Resultados similares foram observados em animais tratados com um agonista sintético dos receptores para grelina em animais com queimadura (SHERIFF *et al.*, 2009) e em músculos obtidos de animais submetidos previamente à desnervação motora e incubados com um agonista seletivo dos OTR (COSTA *et al.*, 2021).

Além dos GPCR acoplados à Gαq também foi observado que o aumento do conteúdo de AMPc intracelular promovido, por exemplo pela ativação da via dependente Gαs é capaz de aumentar a ativação da Akt e suprimir a proteólise muscular (BAVIERA *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2009; LAUTHERBACH *et al.*,

2022; MACHADO *et al.*, 2016). Embora as ações clássicas do AMPc estejam relacionadas com a ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) que demonstrou inibir a proteólise Ca^{2+} em músculos esqueléticos em condições basais (NAVEGANTES *et al.*, 2000), sabe-se que esta quinase também pode atenuar a atividade proteossomal e lisossomal em músculos obtidos de animais sépticos (LIRA *et al.*, 2011), desnervados (GONÇALVES *et al.*, 2012) ou jejuados (SILVEIRA *et al.*, 2014). Para além das ações anti-catabólicas no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos promovidas pelo AMPc/PKA, BAVIERA *et al.* (2010) sugeriram que este nucleotídeo também pode interagir com a proteína trocadora ativada por AMPc (Epac) que culminaria com a ativação da Akt induzida por agonistas β 2-adrenérgicos. De fato, BRENNESVIK *et al.* (2005) demonstraram que a adrenalina potencializa a fosforilação da Akt induzida pela insulina em músculos *soleus* isolados e este efeito foi similar aquele promovido por ativador específico da Epac.

Paradoxalmente ao efeito anti-proteolítico produzido pelo AMPc, MINETTI *et al.* (2011) observaram que a estimulação do GPCR ativado pelo ácido lisofosfatídico, o qual está acoplado à G α i e portanto promove a diminuição do conteúdo de AMPc intracelular, promoveu hipertrofia em miotubos sendo este efeito bloqueado pela PTX. Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que a superexpressão da isoforma constitutivamente ativa da subunidade G α i2 foi capaz de produzir hipertrofia, diferenciação de mioblastos e regeneração muscular sem alterar o *status* de fosforilação da Akt em serina⁴⁷³, indicando que a ativação desta quinase através da fosforilação do resíduo serina⁴⁷³ não participa destes processos.

2.3. Papel da ocitocina na regulação do metabolismo na musculatura esquelética

OT corresponde a um nonapeptídeo constituído por uma parte cíclica como consequência de uma ligação dissulfeto entre os resíduos de aminoácidos 1 e 6 e uma cauda com os demais três aminoácidos (DUVIGNEAUD; RESSLER; TRIPPETT, 1953), sendo produzida principalmente nos neurônios magnocelulares oriundos dos núcleos SON e PVN do hipotálamo (ARMSTRONG, 2015; DUVIGNEAUD *et al.*, 1954) que se projetam para a hipófise posterior, onde liberam a OT na circulação a fim de atuar como hormônio (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2014; MECAWI *et al.*, 2015). Além de sua produção central, outros estudos demonstraram a produção local de OT

em muitos órgãos periféricos como no sistema gastrointestinal (WELCH *et al.*, 2014), cardiovascular (JANKOWSKI *et al.*, 1998), glândula adrenal (NICHOLSON *et al.*, 1984) e músculo esquelético (DEJAGER *et al.*, 2011).

Não obstante a produção de OT em tecidos periféricos foi também demonstrado que para além das ações clássicas em músculos lisos, este neuropeptídeo também pode atuar em músculos esqueléticos, uma vez que este tecido expressa OTR (BRETON *et al.*, 2002). LEE *et al.* (2008) relataram que a OT possui um efeito similar à insulina aumentando a captação de glicose em cultura de células musculares C₂C₁₂. Resultados similares também foram observados em cardiomiócitos sendo este efeito dependente da via de sinalização mediada pela PI3K, uma vez que ele foi bloqueado quando os cardiomiócitos foram co-incubados com wortimanina (FLORIAN; JANKOWSKI; GUTKOWSKA, 2010). É importante mencionar que a sinalização da PI3K, a qual é classicamente estimulada pela insulina, pode culminar com a fosforilação e ativação da Akt com consequente inibição da atividade transcricional de FoxO e diminuição da proteólise proteassomal e lisossomal (SANDRI *et al.*, 2004). Interessantemente, COSTA *et al.* (2021) observaram que a estimulação seletiva dos OTR em músculos *soleus* isolados de ratas atenuou a proteólise e este efeito foi associado com a ativação da Akt, inibição de FoxO e supressão da expressão de MuRF1 e atroquina-1 induzida pela desnervação motora.

COSTA *et al.* (2021) também observaram que ratas tratadas por via intraperitoneal com OT apresentaram aumento da síntese proteica muscular sendo este efeito indireto já que esta ação não foi observada quando os músculos foram incubados com agonista seletivo dos OTR. Corroborando estes resultados, foi demonstrado que a OT aumenta a liberação de insulina *in vitro* (GAO; DREWS; HENQUIN, 1991) e *in vivo* (CHIODERA *et al.*, 1984), a qual é considerada um dos principais agentes hormonais anabólicos e anti-catabólicos no metabolismo de proteínas musculares (KETTELHUT *et al.*, 1994; PEPATO *et al.*, 1996), o que poderia, pelo menos em parte, justificar a melhora da sensibilidade à insulina (ZHANG *et al.*, 2013) e o ganho de massa muscular (ESPINOZA *et al.*, 2021) em pacientes humanos diabéticos tratados periféricamente com OT. DEJAGER *et al.* (2011) observaram que bovinos tratados com esteroides anabólicos apresentaram hipertrofia muscular e este efeito foi acompanhado com aumento na expressão do RNAm para OT e OTR em músculos *longissimus dorsi* e da concentração plasmática de OT. Estes autores então

sugeriram que a sinalização local mediada por este peptídeo pode ser um dos responsáveis pelos efeitos anabólicos no metabolismo de proteínas produzidos pelos esteroides. ERKANLI *et al.* (2013) também demonstraram que a OT é capaz de aumentar a regeneração de fibras musculares e atenuar o conteúdo da protease caspase-3 após isquemia-reperfusão. Estes resultados foram revisitados por ZHANG *et al.* (2019), os quais observaram que a OT induz a diferenciação e proliferação de células satélites musculares, indicando que a OT é um fator regulador da plasticidade muscular. Contudo, ELABD *et al.* (2014) foram os primeiros a claramente demonstrar que a OT está envolvida no controle da massa muscular esquelética, uma vez que eles relataram que animais senescentes e com sarcopenia apresentavam menores concentrações plasmáticas de OT e que a reposição deste hormônio atenuava a perda de massa muscular durante o envelhecimento. Para além destes resultados, animais nocautes para OT desenvolvem sarcopenia mais rapidamente que camundongos normais (ELABD *et al.*, 2014). De fato, os resultados obtidos pelo nosso grupo confirmaram que a estimulação aguda dos OTR atenua a proteólise muscular por meio da inibição da atividade dos sistemas proteolíticos proteassomal e lisossomal sem alteração da proteólise dependente de Ca^{2+} (COSTA *et al.*, 2021). Embora seja conhecido somente um OTR o qual é considerado um membro típico dos GPCR (DEVOST; WRZAL; ZINGG, 2008), os efeitos anti-proteolíticos descritos por COSTA *et al.* (2021) foram associados com a ativação da Akt e inibição de FoxO, indicando que este receptor pode realizar uma sinalização cruzada com a via intracelular mediada pela insulina. Adicionalmente, foi descrito que o OTR pode estar acoplado à Gαq ou Gαi (DEVOST; WRZAL; ZINGG, 2008; STRAKOVA; SOLOFF, 1997). Interessantemente, agonistas de receptores acoplados à Gαq (MORALES *et al.*, 2016) ou Gαi (KLINE *et al.*, 2007) demonstraram ativar a Akt, no entanto, se a atenuação da proteólise muscular induzida pelos OTR depende da ação da Akt é ainda um processo desconhecido.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Avaliar os mecanismos intracelulares envolvidos no efeito anti-proteolítico da estimulação ocitocinérgica em músculos esqueléticos oxidativos de ratas.

3.2. *Objetivos específicos*

- a) Avaliar o papel da OT e do OTR no controle da proteólise total em músculos *soleus* isolados obtidos de ratas em condições basais.
- b) Identificar a(s) via(s) intracelular(es) ativada(s) pela estimulação direta dos OTR em músculos *soleus* isolados obtidos de ratas em condições basais.
- c) Avaliar qual via de sinalização intracelular está envolvida no efeito anti-proteolítico da estimulação ocitocinérgica em músculos *soleus* isolados obtidos de ratas em condições basais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Neste estudo foram utilizadas ratas da linhagem Wistar com aproximadamente 60-90g de massa corporal, cedidas pelo biotério setorial da Universidade Federal de Sergipe. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental, onde receberam dieta balanceada (NUVILAB® CR1, Nuvital, Colombo, Brasil) para roedores e água *ad libitum* em ambiente com ciclos claro-escuro de 12 horas (ciclo claro: 6h00 às 18h00) e temperatura mantida entre 21-25°C. Os experimentos foram realizados pela manhã, sendo iniciados entre 8h00 e 9h00.

Todos os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, sem utilização de anestesia, em acordo com a legislação vigente que permite este método de eutanásia para roedores de até 150g de massa corporal. Os cuidados foram devidamente tomados para minimizar o desconforto e dor. Este método de eutanásia foi escolhido a fim de evitar que os sistemas reguladores do metabolismo proteico muscular não estivessem sujeitos a inibição decorrente do uso de anestésicos (HALTER; PFLUG, 1980; WOOD, 1994).

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa com Animais (CEPA/UFS) sob número de protocolo 62/2017 (Anexo 1) e seguiu as recomendações da Lei Arouca (Lei nº 11.794/2008).

4.2. Procedimentos gerais

4.2.1 Escolha dos animais

A utilização de animais juvenis foi necessária visto que nos experimentos *in vitro* os músculos precisam ser aerados com uma mistura de O₂ e CO₂, desta forma a utilização de músculos obtidos de animais com porte maior impossibilitaria a difusão dos gases e dos nutrientes contidos no meio de incubação.

Ademais, como são bem estabelecidos os efeitos da OT na fisiologia reprodutiva feminina, optou-se por trabalhar com fêmeas neste estudo, além disso,

para que futuramente possamos correlacionar os resultados obtidos até aqui com situações fisiológicas que são acompanhadas por aumento na secreção de OT, como durante o parto, amamentação e desidratação (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2014; CAMERINO, 2023). Vale lembrar também que as fêmeas utilizadas eram pré-pubescentes, assim evitando a variação hormonal decorrente do ciclo estral das mesmas.

Neste estudo, músculos *soleus* foram utilizados uma vez que no trabalho realizado por COSTA *et al.*, (2021), o efeito anti-proteolítico do OTR foi identificado somente neste tipo muscular.

4.2.2. Delineamento experimental

Os sets de grupos experimentais utilizados em cada procedimento estão descritos abaixo:

- a) Concentrações crescentes (0,1; 1,0 e 10 μ M) de ocitocina (Farmacêutica, SE, Brasil; diluída no meio de incubação), do WAY-267,464 (WAY; agonista seletivo não-peptídico do OTR; Sigma Aldrich, código SML2223, diluído em DMSO) e do atosiban (ATB, antagonista do OTR; Santa Cruz Biotechnology, código sc-254947, diluído no meio de incubação) foram utilizadas para avaliar a proteólise total *in vitro* em músculos *soleus* de ratas. Os músculos do grupo Controle foram incubados em tampão Krebs adicionado de volumes proporcionais dos veículos. Em um segundo protocolo, foi realizada a incubação concomitante com WAY-267,464 e atosiban, nas menores concentrações onde os efeitos anti-proteolíticos e proteolíticos foram observados, respectivamente.
- b) Para avaliar as possíveis vias intracelulares ativadas pela estimulação do OTR, músculos *soleus* foram isolados e incubados por 15, 30 e 60 minutos com WAY na menor concentração onde o efeito anti-proteolítico desta droga foi confirmado. Após cada etapa temporal, os músculos foram imediatamente congelados em N₂ e posteriormente processados para avaliação do conteúdo de substratos fosforilados pela PKA e PKC, SIK-1 (um alvo de direto da proteína de ligação em resposta ao AMPc,

isto é, CREB; STEWART *et al.*, 2012), da pSer⁴⁷³-Akt e Akt total.

- c) Para avaliar a participação da proteína G α i nos efeitos anti-proteolíticos induzidos pela estimulação dos OTR, músculos *soleus* foram incubados com WAY (1,0 μ M), toxina *pertussis* (PTX, 100ng.mL⁻¹) (ESSID; BEVINGTON; BRUNSKILL, 2019; NING *et al.*, 2023) e com WAY + PTX. Músculos Controle foram mantidos em tampão Krebs. É importante mencionar que a PTX é uma toxina que inibe a troca de nucleotídeos de guanina pelas proteínas G α i, desta forma, esperar-se-ia o aumento de AMPc intracelular decorrente da não inibição da adenilato ciclase pela G α i (MANGMOOL; KUROSE, 2011). Em sequência, novos grupos foram formados e o efeito da exposição por 30 minutos com WAY adicionado ou não com PTX foi utilizado para avaliação do conteúdo de substratos fosforilados pela PKA e de LC3. A PTX foi obtida da empresa Sigma Aldrich, código P7208 e diluída em tampão Krebs.
- d) Posteriormente, a participação da via de sinalização mediada pela proteína G α q na atenuação da proteólise induzida pela estimulação do OTR em músculos *soleus* foi avaliada através da incubação destes músculos na presença de WAY (1,0 μ M), BAPTA-AM (50 μ M, (CARRASCO *et al.*, 2003; FERDOWSI *et al.*, 2022) e WAY+ BAPTA-AM. Neste protocolo, procurou-se inibir a participação do Ca²⁺ nos efeitos do WAY, já que o BAPTA-AM é um quelante de Ca²⁺ permeável à membrana. Posteriormente, músculos *soleus* foram incubados por 30 minutos com WAY, BAPTA-AM e WAY+ BAPTA-AM e os conteúdos de substratos fosforilados pela PKC e LC3 foram avaliados. O BAPTA-AM foi obtido da empresa Santa Cruz Biotechnology, código sc-202488 e diluído em DMSO. Posteriormente, músculos *soleus* foram isolados e incubados com WAY (1,0 μ M), 2-APB (100 μ M; ZHU *et al.*, 2011) e WAY + 2-APB e proteólise total foi avaliada. Além disso, os conteúdos de substratos fosforilados pela PKC, da LC3, da pSer⁴⁷³-Akt e Akt total e pSer²⁵³-FoxO1 foram avaliados após 30 minutos de ação destas moléculas. Vale mencionar que o 2-APB é um inibidor dos receptores para IP3 (IP3R), os quais são receptores ionotrópicos condutores de Ca²⁺ ativados pelo IP3 presentes na membrana do retículo sarcoplasmático

(ZHU *et al.*, 2011). O 2-APB foi obtido da empresa Sigma Aldrich, código D9754 e diluído em metanol.

- e) Por fim, a participação da Akt nos efeitos anti-proteolíticos induzidos pelo WAY foi avaliada. Para isso, músculos *soleus* foram incubados com WAY (1,0 μ M), tricitiribina (10 μ M; GONÇALVES *et al.*, 2012) e WAY + tricitiribina e proteólise total foi mensurada. Adicionalmente, os conteúdos de pSer⁴⁷³-Akt e Akt total, pSer²⁵³-FoxO1 e LC3 foram avaliados após 30 minutos de ação destas moléculas. A tricitiribina é uma molécula inibidora seletiva da Akt (GONÇALVES *et al.*, 2012), foi obtida da empresa Santa Cruz Biotechnology, código sc-200661A e diluída em DMSO.

4.2.3. Procedimento experimental para a análise da proteólise em músculos *soleus* de ratas

Para avaliar o efeito da estimulação ocitocinérgica na proteólise total, os músculos *soleus* foram coletados de ratas em condições basais e incubados na presença de WAY e/ou das demais substâncias citadas em 4.2.2. Após a coleta, os músculos foram presos por meio dos seus tendões em suportes de alumínio, mantendo-os no comprimento de repouso, mantidos sob leve agitação à 37°C em banho Dubnoff e incubados em tampão Krebs Ringer Bicarbonato, pH7,4 (0,120M de NaCl; 0,015M de NaHCO₃; 4,828mM de KCl; 1,2mM de MgSO₄; 1,212mM de KH₂PO₄; 2,4mM de CaCl₂) adicionado de 5mM.L⁻¹ de glicose, 0,5mM.L⁻¹ de ciclohexamida (um inibidor da síntese proteica) e aerados com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) durante 1h com o intuito de estabelecer o equilíbrio da velocidade de liberação da tirosina para o meio de incubação. Após este período, os meios foram renovados e os músculos incubados por 2h nas mesmas condições descritas inicialmente (COSTA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2012; LIRA *et al.*, 2011; NAVEGANTES *et al.*, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2014). Posteriormente, 1mL do meio foi coletado para avaliação da proteólise total que foi mensurada através da taxa de liberação de tirosina no meio de incubação. O aminoácido tirosina foi escolhido por não ser catabolizado e nem sintetizado *de novo* pelo músculo esquelético (JEFFERSON; LI; RANNELS, 1977), além de ser facilmente dosado pelo método

fluorimétrico (WAALKES; UDENFRIEND, 1957).

4.3. Dosagem de proteínas

Após as incubações, músculos *soleus* foram coletados e homogeneizados no TissueLyser II por 2 minutos a uma frequência de 25 agitações/s em solução tampão RIPA (pH 7,4) acrescido de inibidores de proteases (1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 5 μ g.mL⁻¹ de aprotinina e 1 μ g.mL⁻¹ de leupeptina) e de fosfatases (10,09mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10,28mM de ortovanadato de sódio). O homogenato foi centrifugado a 15.000 RPM à 4°C e o sobrenadante coletado e diluído 200X em água mili-Q para a dosagem de proteínas por meio do método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

4.4. Análise de proteínas através do western blotting

Após a dosagem das proteínas obtidas dos extratos musculares (como descrito no item 4.3), o homogenato foi misturado com volumes iguais de tampão Laemmli (20% de glicerol, 125mM de Tris, 4% de SDS, 100mM de ditiotreitol, 0,02% de azul de bromofenol, pH 6,8) foram misturados, aquecidos à 70°C por 5 minutos e submetidos à eletroforese em gel de SDS-PAGE de 10 a 16%. A eletro-transferência das proteínas do gel para membrana foi realizada a 400mA em sistema de transferência semi-seco por 30 min. Após o bloqueio (leite desnatado 5%), as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos e posteriormente com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, conforme **tabela 1** abaixo. A revelação foi feita após incubação das membranas com reagente amplificador de quimioluminescência (1M de Tris-HCL, pH 8,5; 250mM de luminol; 90mM de ácido p-coumárico; peróxido de hidrogênio e água mili-Q) no aparelho iBright Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific). A análise quantitativa dos *blottings* foi realizada através de quantificação da intensidade das bandas por densitometria utilizando o iBright Analysis Software®. Após serem quantificados, os valores foram corrigidos pela densitometria da β -actina, proteína utilizada como controle de carregamento.

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados neste estudo.

Nome	Código	Marca	Diluição
Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrate Antibody	#9621	Cell Signaling	1:1000
Phospho-(Ser) PKC Substrate Antibody	#2261	Cell Signaling	1:1000
Akt Antibody	#9272	Cell Signaling	1:500
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP®	#4060	Cell Signaling	1:500
p-FKHR (Ser 256)	sc-101681	Santa Cruz Biotechnology	1:500
LC3 polyclonal antibody	PA 146286	Invitrogen	1:1000
βActin Anticorpo (C-2)	sc-8432	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	31430	Invitrogen	1:3000
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	31460	Invitrogen	1:2000

4.5. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via (fator= OT, WAY, atosiban ou tempo) ou de duas vias (fator 1= WAY, fator 2: presença de atosiban, PTX, BAPTA-AM, 2-APB ou triciribina) seguido de pós teste de Bonferroni, quando necessário. O nível de significância aceito foi de 5% (i.e., $p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

O efeito *in vitro* da estimulação do OTR na degradação de proteínas foi inicialmente avaliado estimando a liberação de tirosina de músculos *soleus* incubados com diferentes concentrações (0,1; 1,0 e 10 μ M) de WAY, um agonista não peptídico de OTR (RING *et al.*, 2010). Conforme mostrado na **Figura 2a**, a análise de variância de uma via revelou que 1,0 e 10 μ M de WAY foram capazes de inibir a taxa de proteólise em cerca de 25% e 20%, respectivamente, em comparação com o controle. Com base nesses dados, os músculos foram incubados com OT nas duas concentrações mais baixas testadas no experimento com WAY. A proteólise não foi alterada pela presença de 0,1 μ M de OT em relação ao controle, mas 1,0 μ M atenuou a degradação de proteínas em cerca de 64% ($p < 0,01$) em comparação com o controle (**Figura 2b**).

Posteriormente, foi avaliada a contribuição do OTR na regulação da proteólise em músculos *soleus* incubados com concentrações crescentes de atosiban, um antagonista dos OTR (CICUTTI *et al.*, 1999). Neste experimento, nenhuma das concentrações testadas alterou a taxa de degradação proteica total em comparação ao grupo Controle. No entanto, a concentração de 10 μ M elevou significativamente o conteúdo de tirosina em relação aos músculos incubados com 1,0 μ M deste antagonista (**Figura 2c**) e por isso essa concentração foi usada no experimento seguinte. Assim, músculos foram co-incubados com WAY (1,0 μ M) e atosiban (10 μ M). Como esperado, a ANOVA de duas vias apontou que o WAY atenuou a proteólise (~39% vs. Controle) e este efeito foi bloqueado pelo atosiban (**Figura 2d**).

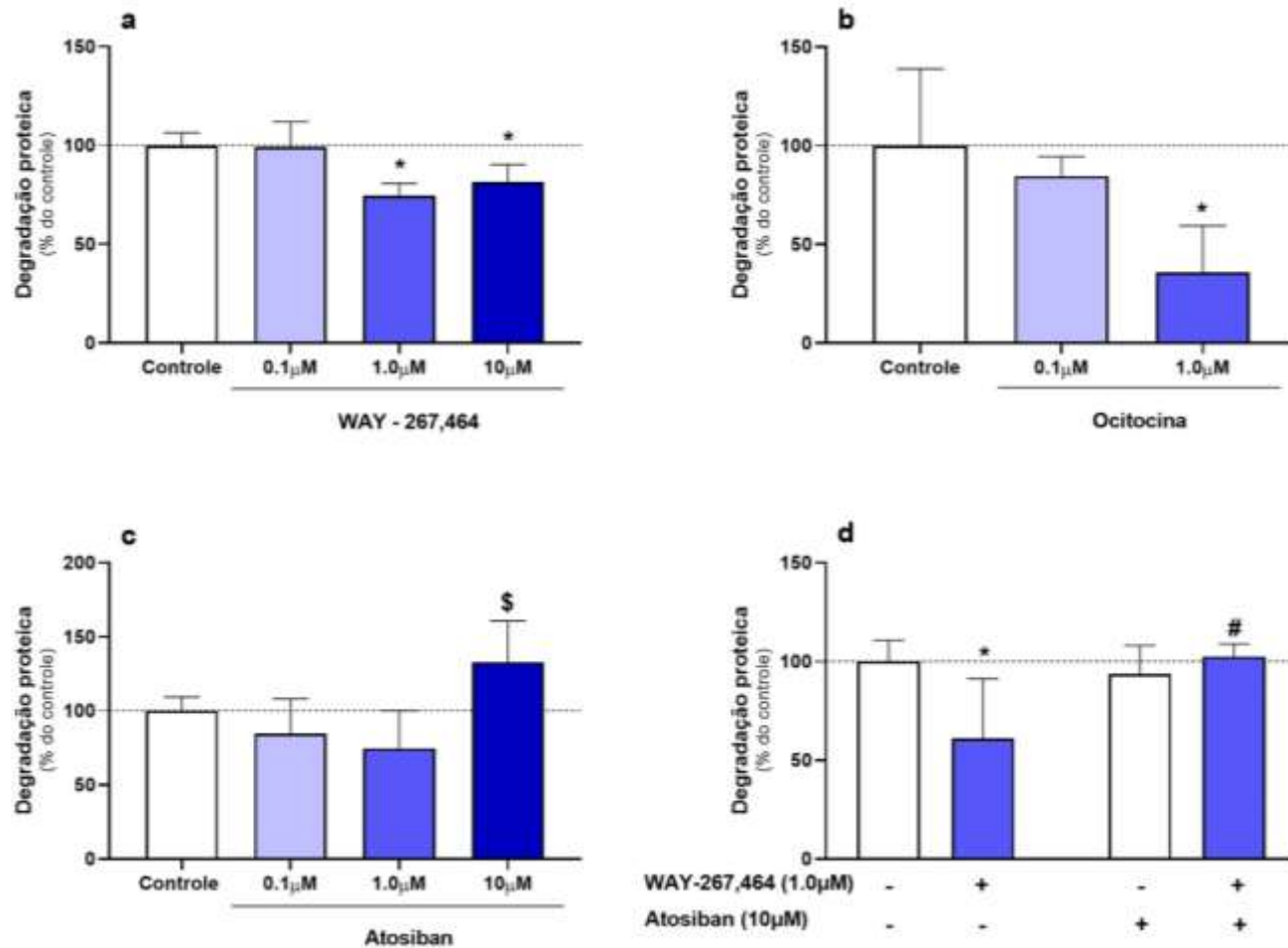


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações do agonista dos receptores para ocitocina (OTR), WAY-267,464 (**a**), de ocitocina (OT, em **b**), e do antagonista dos receptores para OT, atosiban (**c**) e da co-incubação de 1,0 μ M de WAY-267,464 e 10 μ M de atosiban (**d**) na proteólise total em músculos *soleus* de ratos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA) de uma via (em **a**, **b** e **c**) ou de duas vias (em **d**) seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. Controle; \$ $p < 0,05$ vs. 1,0 μ M de atosiban e # $p < 0,05$ vs. 1,0 μ M de WAY-267,464; $n = 5-7$ /grupo.

Confirmado o efeito anti-proteolítico da estimulação dos OTR e baseando-se no fato de que este receptor pode estar acoplado à Gαq ou Gαi (ZHOU *et al.*, 2007), posteriormente foram avaliadas quais as vias de sinalização intracelulares que poderiam mediar as ações anti-catabólicas observadas neste estudo. Assim, músculos *soleus* foram expostos por 15, 30 e 60 minutos a 1,0 μM de WAY e o conteúdo de proteínas fosforiladas pela PKA e PKC foram mensuradas como parâmetro indireto da atividade destas quinases (MACHADO *et al.*, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2020). Conforme é apontado na **Figura 3a**, não houve alteração da atividade da PKA em nenhum dos tempos avaliados, contudo o conteúdo de proteínas fosforiladas pela PKC esteve elevado entre 15 e 30 minutos (~28 e 20%, respectivamente) em relação ao grupo Controle, normalizando-se aos 60 minutos de incubação. Adicionalmente, o conteúdo da proteína SIK-1 também foi mensurado como parâmetro de ativação de CREB uma vez que além da PKA (STEWART *et al.*, 2012), a PKC também pode fosforilar este fator de transcrição (MAO; TANG; WANG, 2007) e consequentemente aumentar a expressão de SIK-1. Corroborando os resultados descritos acima, o conteúdo de SIK-1 aumentou aproximadamente 65 e 76% após 30 e 60 minutos de exposição ao WAY, respectivamente, em relação ao Controle (**Figura 3c**). Além disso, a ativação da Akt, mensurada pela sua fosforilação no resíduo serina⁴⁷³ foi aumentada pelo WAY desde os 15 minutos e se manteve alta até 60 minutos de estimulação com o agonista do OTR em relação ao Controle (**Figura 3d**). Imagens representativas são apresentadas na **Figura 3e**.

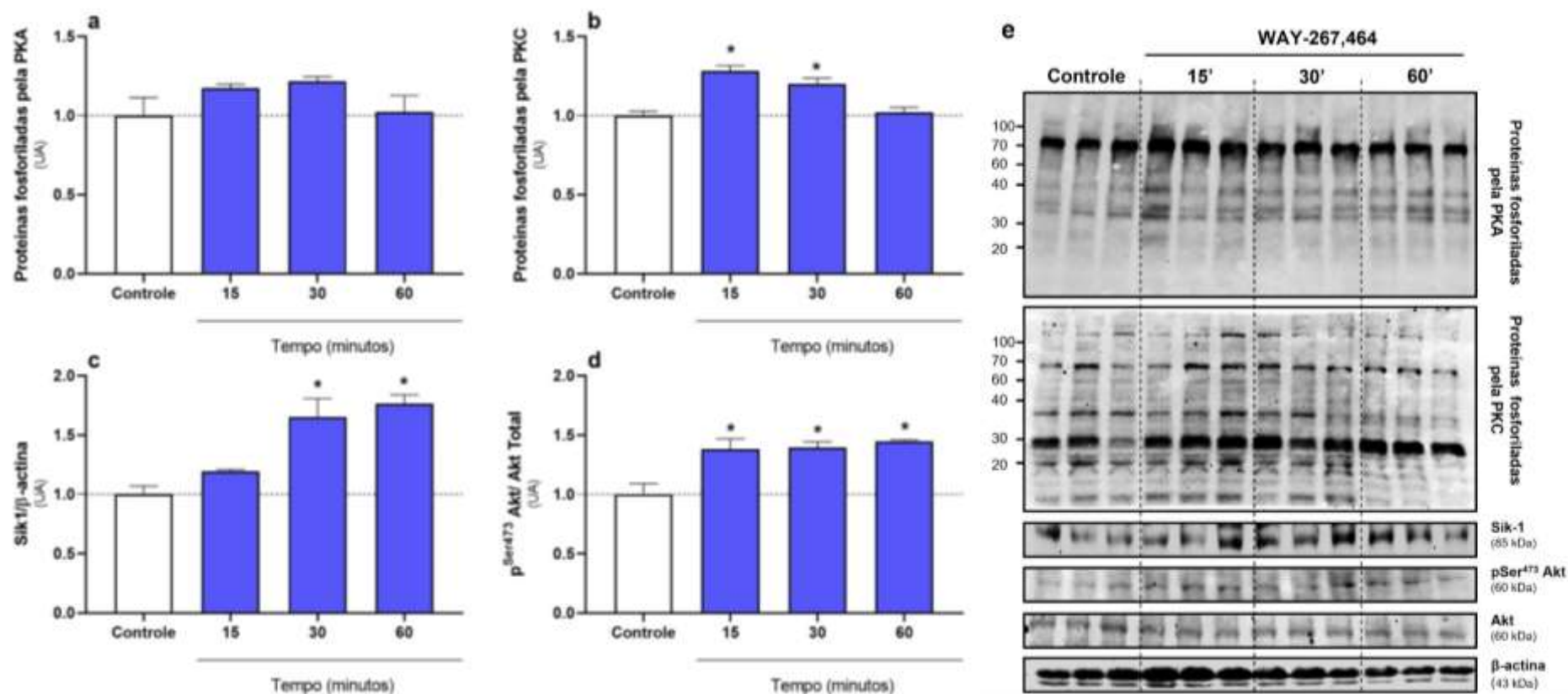


Figura 3. Efeito temporal do WAY-267,464 nos conteúdos de proteínas fosforiladas pelas proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA, em **a**), e de Ca^{2+} (PKC, em **b**), de SIK-1 (**c**) e de pSer⁴⁷³-Akt (**d**) em músculos *soleus* de ratas em condições basais. Imagens representativas dos blotings (**e**). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. Controle; $n = 3/\text{grupo}$.

Embora a atividade da PKA, mensurada indiretamente pelo conteúdo de substratos fosforilados por esta quinase, não tenha sido alterada pelo WAY, o que indica que possivelmente o efeito anti-proteolítico observado após a estimulação do OTR não é dependente da via Gai a qual, classicamente, ao inibir a adenilato ciclase diminuiria o conteúdo de AMPc e a atividade da PKA, sabe-se também que receptores acoplados à Gai podem disparar vias de sinalizações não clássicas que poderiam inibir a proteólise muscular, por exemplo, ativando a PKC (MINETTI *et al.*, 2011). Desta forma, para elucidar uma possível contribuição da Gai nas ações anti-catabólicas do OTR observadas neste estudo, músculos *soleus* foram incubados com WAY (1,0 μ M) e/ou com PTX (100ng.mL⁻¹; ESSID; BEVINGTON; BRUNSKILL, 2019; NING *et al.*, 2023) e a proteólise total mensurada (**Figura 4a**). Como esperado, o WAY atenuou a degradação proteica (~40% vs. Controle), porém este efeito não foi bloqueado pela PTX. Contudo a ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo da PTX no conteúdo de substratos fosforilados pela PKA, não havendo interação com a presença do WAY (**Figura 4b**). Embora a PTX sozinha não tenha alterado a proteólise ($p = 0,081$ vs. Controle), observou-se uma diminuição do conteúdo de LC3 I e LC3II (~27 e ~45% vs. Controle, respectivamente), marcadores do sistema autofágico-lisossomal em músculos incubados com esta toxina (**Figura 4c**). Resultados similares foram observados nos grupos WAY e WAY+PTX. Imagens representativas estão na **Figura 4d**.

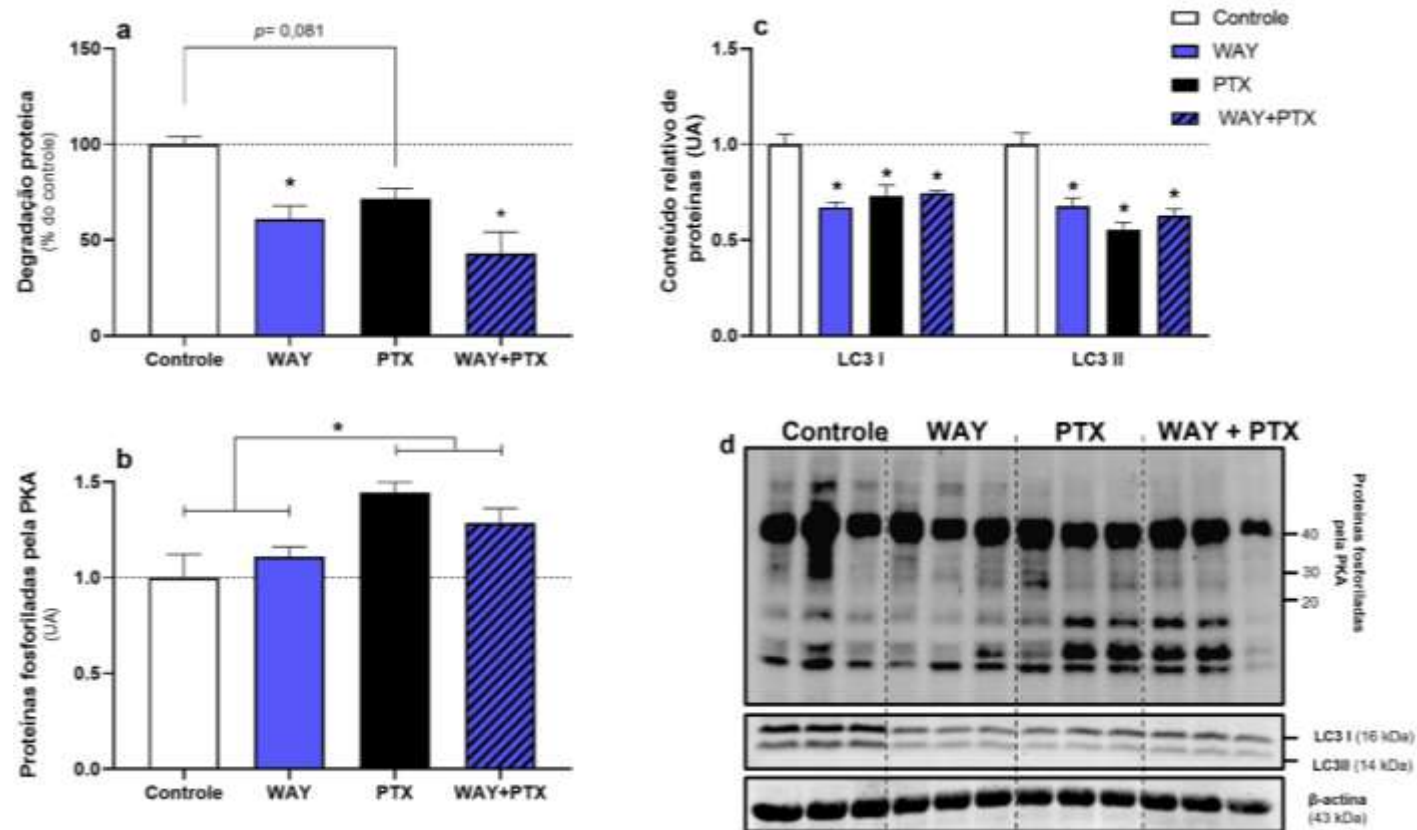


Figura 4. Efeito do WAY-267,464 (1,0 μ M) e da toxina *Pertussis* (PTX, 100ng.mL⁻¹) na proteólise total (**a**, n=6/grupo) e no conteúdo de proteínas fosforiladas pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA, em **b**) e dos marcadores de autofagia, LC3 I e LC3 II (**c**) em músculos *soleus* de ratas em condições basais. Imagens representativas dos blottings (**d**). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni. **p*<0,05 vs. Controle. Em **b-d**, os resultados correspondem a 30 minutos de exposição aos agentes (n=3/grupo).

Em sequência, a participação da via de sinalização canônica mediada pela Gαq nos efeitos anti-proteolíticos induzidos pela estimulação do OTR em músculos esqueléticos foi avaliada. Para isso, músculos *soleus* foram incubados com WAY (1,0μM), com um quelante intracelular de Ca²⁺, BAPTA-AM (50μM) e com WAY + BAPTA-AM e a taxa de degradação proteica total foi então avaliada. Conforme apresentado na **Figura 5a**, tanto o WAY como o BAPTA-AM diminuíram a proteólise em cerca de 18 e 44% em relação ao Controle e desta forma, o efeito anti-catabólico do WAY não foi bloqueado pelo quelante de Ca²⁺. Adicionalmente, a presença do BAPTA-AM bloqueou completamente o aumento no conteúdo de substratos fosforilados pela PKC induzido pelo WAY (**Figura 5b**), indicando que a concentração desta droga usada neste estudo foi suficiente para quelar o Ca²⁺ intracelular. Para substanciar ações anti-catabólicas no metabolismo de proteínas musculares do WAY e do BAPTA-AM, o conteúdo de LC3I e LC3II foi mensurado em todos os grupos, sendo todos eles menores em relação ao grupo Controle (**Figura 5c-d**).

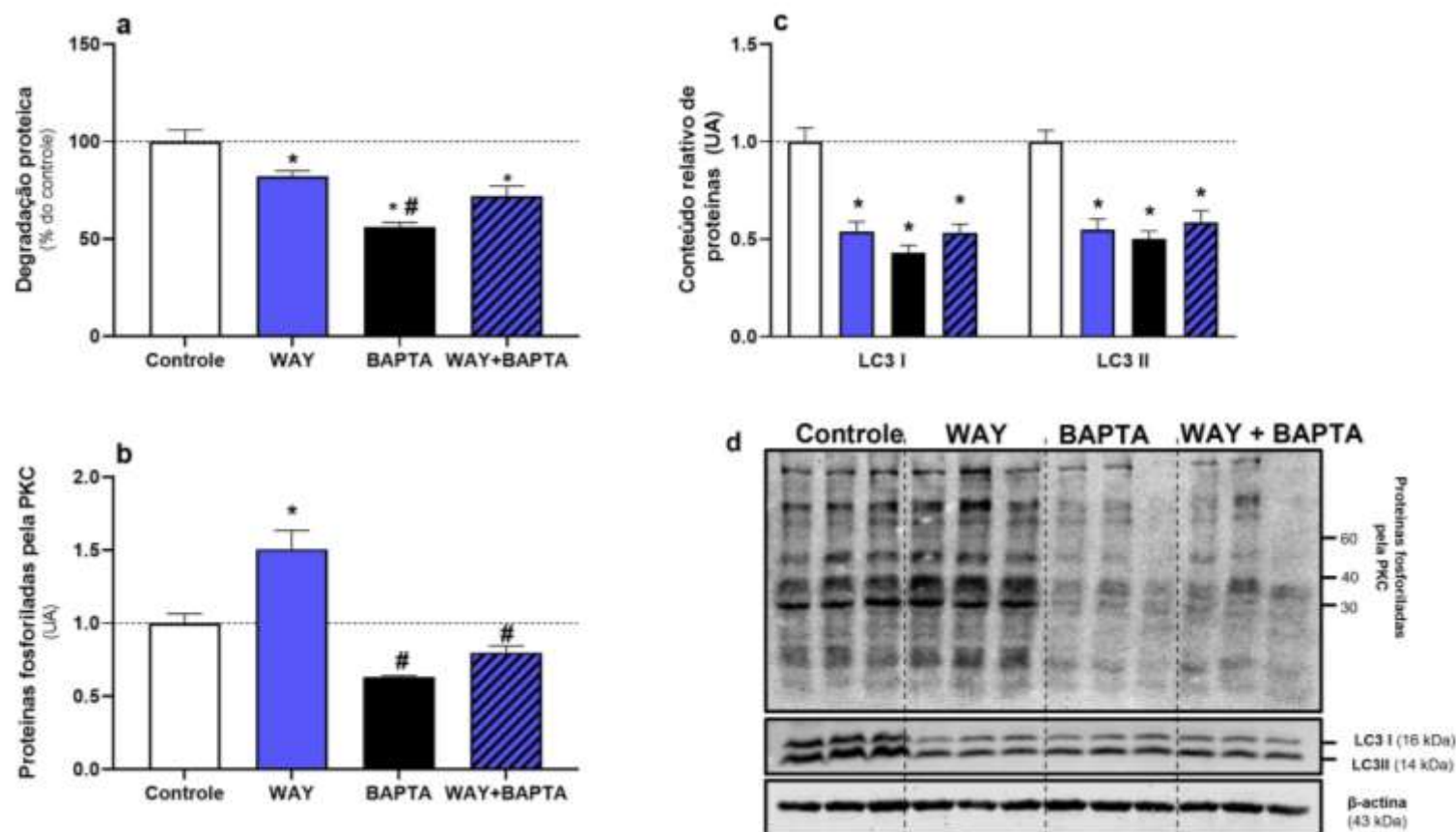


Figura 5. Efeito do WAY-267,464 (1,0 μ M) e do BAPTA-AM (50 μ M) na proteólise total (**a**, n=7/grupo) e no conteúdo de proteínas fosforiladas pela proteína quinase dependente de Ca^{2+} (PKC, em **b**) e dos marcadores de autofagia, LC3 I e LC3 II (**c**) em músculos *soleus* de ratas em condições basais. Imagens representativas dos blottings (**d**). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. Controle; # $p < 0,05$ vs. WAY. Em **b-d**, os resultados correspondem a 30 minutos de exposição aos agentes (n=3/grupo).

Para tentar elucidar o envolvimento da possível elevação no conteúdo intracelular de Ca^{2+} músculos *soleus* foram então incubados com WAY (1,0 μM), com o inibidor do IP3R, 2-APB (100 μM) e com WAY + 2-APB. Conforme apresentado na **Figura 6a**, enquanto o WAY produziu atenuação (~15% vs. Controle) da proteólise que foi associada com o aumento da fosforilação da Akt e FoxO1 e consequente atenuação da expressão de LC3I e LC3II (**Figura 6c-e**), o 2-APB sozinho elevou a proteólise total (~20% vs. Controle) e quando associado com WAY, completamente bloqueou o efeito anti-proteolítico do agonista do OTR. Interessantemente, a atividade da PKC, mensurada indiretamente pela quantificação do conteúdo de substratos fosforilados por esta quinase, também foi bloqueada na presença do 2-APB (~25% vs. Controle) e de WAY + 2-APB (~20% vs. WAY; **Figura 6b**).

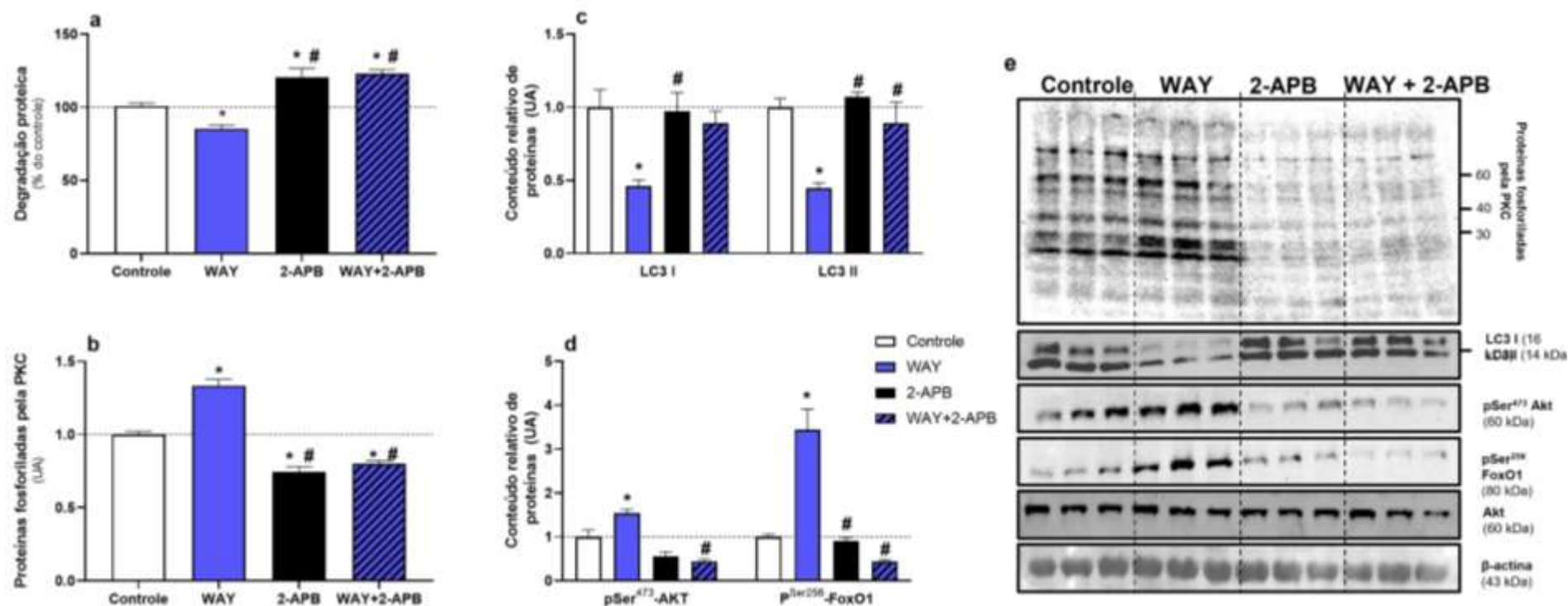


Figura 6. Efeito do WAY-267,464 (1,0μM) e do 2-APB (100μM) na proteólise total (**a**, n=8/grupo) e no conteúdo de proteínas fosforiladas pela proteína quinase dependente de Ca²⁺ (PKC, em **b**), dos marcadores de autofagia, LC3 I e LC3 II (**c**) de pSer⁴⁷³-Akt e pSer²⁵⁶-FoxO1 (**d**) em músculos *soleus* de ratas em condições basais. Imagens representativas dos blottings (**e**). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni. *p<0,05 vs. Controle; #p<0,05 vs. WAY. Em **b-e**, os resultados correspondem a 30 minutos de exposição aos agentes (n=3/grupo).

Posteriormente, uma vez que foi observado neste estudo aumento da ativação da Akt após exposição ao WAY assim como no estudo conduzido por COSTA *et al.* (2021), mensurada pelo conteúdo desta quinase fosforilada no resíduo serina⁴⁷³, a qual está associada com a fosforilação de FoxO e inibição dos sistemas proteolíticos proteassomal (GONÇALVES *et al.*, 2009) e lisossomal (BERTAGGIA; COLETTI; SANDRI, 2012; PAULA-GOMES *et al.*, 2013), foi avaliado se esta enzima está envolvida no efeito anti-proteolítico do WAY no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos. Desta forma, músculos *soleus* foram incubados com WAY (1,0μM), tricitiribina (10μM) e WAY+Tricitiribina. Vale lembrar que a tricitiribina é um agente inibidor da Akt na concentração testada (BAVIERA *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2012). Como apresentado na **Figura 7a**, o WAY diminui a proteólise total (~25% vs. Controle), enquanto a tricitiribina isolado não produziu qualquer alteração neste processo. No entanto, a presença da tricitiribina bloqueou completamente a redução da proteólise induzida pelo WAY. O efeito anti-proteolítico do WAY foi associado com redução do conteúdo da LC3I e LC3II (~48% e ~39% vs. Controle, respectivamente, **Figura 7b**), provavelmente devido a maior fosforilação da Akt (~55% vs. Controle) com consequente inibição, por meio do aumento da fosforilação, de FoxO1 (~180% vs. Controle, **Figura 7c**). Adicionalmente, a presença da Tricitiribina no meio de incubação contendo WAY, bloqueou completamente a ativação da Akt, a inibição de FoxO1 e redução do conteúdo de LC3I e LC3II promovida pela agonista seletivo dos OTR (**Figura 7b-d**).

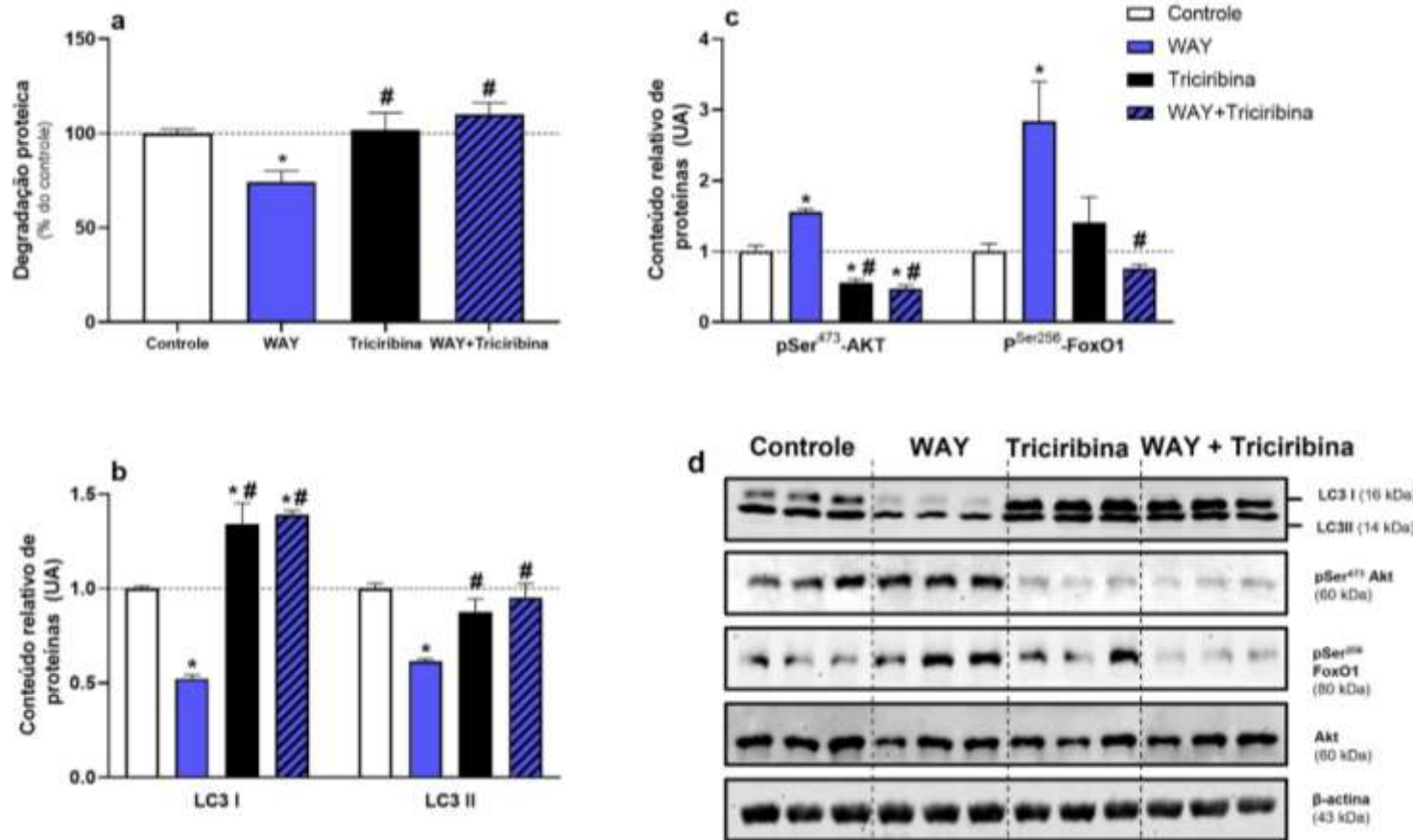


Figura 7. Efeito do WAY-267,464 (1,0μM) e da triciribina (10μM) na proteólise total (**a**, n=7/grupo) e no conteúdo dos marcadores de autofagia, LC3 I e LC3 II (**b**) e de pSer⁴⁷³-Akt e pSer²⁵⁶-FoxO1 (**c**) em músculos *soleus* de ratas em condições basais. Imagens representativas dos blottings (**d**). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni. *p<0,05 vs. Controle; #p<0,05 vs. WAY. Em **b-d**, os resultados correspondem a 30 minutos de exposição aos agentes (n=3/grupo).

6. DISCUSSÃO

Anteriormente, nosso grupo demonstrou que a estimulação dos OTR reduziu a degradação total de proteínas no músculo *soleus* em condições basais, que foi acompanhada por reduções nas atividades dos sistemas proteolíticos proteassomal e autofágico/lisossomal (COSTA *et al.*, 2021). Para compreender melhor as propriedades anti-catabólicas mediadas pelos OTR neste tecido, foi realizada uma curva concentração-resposta com OT e o efeito deste neuropeptídeo na degradação de proteínas foi avaliado. Foi observado que enquanto a menor concentração de OT testada neste estudo, isto é, 0,1µM, não produziu qualquer efeito, a concentração de 1,0µM reduziu a taxa de proteólise de total em *soleus*. Resultados similares foram observados com o uso de um agonista não-peptídico altamente seletivo dos OTR, WAY, corroborando que a estimulação dos OTR tem propriedades anti-catabólicas no músculo esquelético oxidativo de ratas, inclusive em concentrações menores do que a relatada anteriormente (Costa *et al.*, 2021).

Embora o SON e PVN sejam os principais locais conhecidos para a síntese de OT (ARMSTRONG, 2015; DUVIGNEAUD *et al.*, 1954), existem alguns relatos na literatura indicando que outros tecidos também podem produzir esse peptídeo (DEJAGER *et al.*, 2011; JANKOWSKI *et al.*, 1998; NICHOLSON *et al.*, 1984; WELCH *et al.*, 2014). Em células musculares esqueléticas, foi demonstrado a expressão de RNAm para OT e OTR em mioblastos humanos (BRETON *et al.*, 2002) e células C₂C₁₂ (BERIO *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2008), contudo uma expressão significativamente maior tanto do ligante quanto do receptor foi observada durante a diferenciação em miotubos (BERIO *et al.*, 2017). Um aumento no conteúdo de OT e OTR também parece mediar os efeitos anabólicos de diferentes hormônios esteroides no músculo esquelético (DEJAGER *et al.*, 2011; KONGSUWAN *et al.*, 2012), indicando que este peptídeo também possa exercer um efeito autócrino e/ou parácrino sobre as células musculares esqueléticas (CAMERINO, 2023). Desta forma, foi avaliado o efeito do atosiban (ATB), um antagonista dos OTR (BÜSCHER, 2001) na taxa de degradação de proteínas, contudo, não houve diferença significativa em comparação ao Controle, indicando que a OT não exerce efeitos tônicos inibitórios na proteólise muscular. Apesar disso, 10µM de ATB elevou a degradação proteica quando comparado as concentrações menores deste antagonista, o que poderia ser explicado por uma possível ação em V1aR (KATTE; KASSIOU, 2017), uma vez que como dito

anteriormente, a superexpressão deste receptor atenuou a atrofia e a expressão de atrogina-1 induzida pelo TNF- α em músculos de camundongos (COSTA *et al.*, 2014). Adicionalmente, o efeito anti-proteolítico do WAY foi completamente bloqueado na presença do ATB. Resultados similares foram observados por COSTA *et al.* (2021), que demonstraram que o L-371,257, um antagonista altamente seletivo dos OTR (WYATT *et al.*, 2002), aboliu a diminuição da degradação proteica em músculos *soleus* de ratas induzida pelo WAY (COSTA *et al.*, 2021).

OTR é relatado como um membro da família de GPCR podendo estar associado à G α_q ou G α_i , dependendo do tecido (REVERSI *et al.*, 2005). Enquanto a sinalização mediada pela G α_q canonicamente depende do aumento da concentração citoplasmática de Ca $^{2+}$ promovida pela efluxo deste íon a partir do retículo sarcoplasmático induzido pelo IP3 e consequente ativação da PKC, que por sua vez fosforila vários alvos citoplasmáticos (DEVOST; WRZAL; ZINGG, 2008), a G α_i inibe a atividade da adenilato ciclase (AC), diminuindo as concentrações de AMPc e a atividade da PKA (IANCU; JONES; HARVEY, 2007). Por outro lado, tem sido amplamente demonstrado que aumento de AMPc intracelular suprime a degradação de proteínas (BAVIERA *et al.*, 2007; LIRA *et al.*, 2007, 2011) através da atenuação das atividades dos sistemas proteolíticos Ca $^{2+}$ -dependente (NAVEGANTES *et al.*, 2000), proteassomal (GONÇALVES *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2014) e autofágico (LAUTHERBACH *et al.*, 2022; MACHADO *et al.*, 2016, 2019). Portanto, caso o OTR seja acoplado a G α_i no músculo esquelético, esperar-se-ia um aumento na taxa de proteólise.

Neste sentido, avaliou-se o efeito temporal do WAY indiretamente na atividade da PKC e PKA, através da mensuração do conteúdo de substratos fosforilados por estas quinases. Embora não tenhamos observado diferença significativa na atividade da PKA em nenhum dos tempos avaliados, a atividade da PKC aumentou significativamente após 15 e 30 minutos de incubação com WAY. Adicionalmente, o conteúdo de SIK-1 também esteve elevado após 30 e 60 minutos de exposição ao WAY. Sabidamente, SIK-1 é um alvo-direto de p Ser -CREB (STEWART *et al.*, 2012), enquanto PKA é considerada a principal quinase de CREB, foi previamente demonstrado que a PKC também é capaz de fosforilar este fator de transcrição no mesmo resíduo que a PKA (THONBERG *et al.*, 2002; XIE; ROTHSTEIN, 1995), o que poderia justificar o aumento de SIK-1 observado neste estudo. Além disso, o conteúdo

de p^{Ser473}-Akt também foi elevado após incubação de músculos *soleus* com WAY durante os três tempos analisados. Em conjunto, estes dados apontam que o efeito anti-proteolítico induzido pela estimulação dos OTR em músculos esqueléticos provavelmente é mediado pela Gαq e está associado com a ativação da Akt, a qual é considerada uma das principais reguladoras do metabolismo proteico muscular (BODINE *et al.*, 2001b; EBERT *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2007). No entanto, um estudo interessante realizado por MINETTI *et al.* (2011) demonstrou que a ativação do receptor para ácido lisofosfatídico (LPA), o qual é um GPCR, produziu hipertrofia em miofibros e este efeito foi bloqueado na presença da PTX, indicando que este receptor está acoplado à Gαi. Neste mesmo estudo, a superexpressão da isoforma 2 da Gαi em células musculares C₂C₁₂ induziu hipertrofia através de um mecanismo dependente de PKC, indicando que GPCR associados à Gαi podem estimular vias não clássicas que envolvem a ativação da PKC. Desta forma, a ausência de efeito inibitório do WAY no conteúdo de substratos fosforilados pela PKA observado neste estudo não foi negligenciado como parâmetro de ativação do OTR-Gαi e assim, posteriormente avaliou-se a proteólise total em músculos incubados com WAY e PTX.

Como esperado o WAY atenuou a proteólise total, contudo este efeito não foi bloqueado pela PTX, indicando que a ação anti-proteolítica em músculos *soleus* induzida pela estimulação do OTR não é mediado pela via Gαi. Ademais, o conteúdo de substratos fosforilados pela PKA esteve aumentado somente nos grupos expostos a esta toxina, confirmando sua ação inibitória sobre a via mediada pela Gαi. A diminuição da degradação proteica induzida pelo WAY foi associada a atenuação do conteúdo dos marcadores de autofagia, LC3I e LC3II, corroborando os dados obtidos anteriormente por COSTA *et al.* (2021), que demonstraram que sob condições basais, o WAY diminui a atividade proteolítica autofágica/lisossomal em músculos *soleus* de ratas. Além disso, o aumento no conteúdo de substratos fosforilados pela PKA nos grupos expostos à PTX sugere que esta quinase pode estar envolvida na diminuição da autofagia, conforme apontado pela redução do conteúdo de LC3I e LC3II observada neste estudo e corroborado por trabalhos anteriores (CHERRA *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2016, 2019).

Em sequência, avaliou-se o papel da via OTR-Gαq no controle da proteólise muscular. Uma vez que esta via de sinalização tem sido amplamente associada ao aumento de Ca²⁺ intracelular (CAMERINO, 2023; LEE *et al.*, 2008; STRAKOVA;

SOLOFF, 1997; ZHOU *et al.*, 2007), incubamos músculo *soleus* com um quelante intracelular de cálcio (BAPTA-AM) em associação com WAY e a degradação de proteínas foi avaliada. Assim como o WAY, isoladamente o BAPTA-AM atenuou a proteólise muscular e quando associados, não houve bloqueio do efeito anti-catabólico produzido pelo WAY. Embora a elevação no conteúdo de substratos fosforilados pela PKC induzida pelo agonista do OTR tenha sido totalmente bloqueada pelo BAPTA-AM, o conteúdo de LC3I e LC3II permaneceu diminuído em todos os grupos em relação ao Controle. Assim, é possível que a presença do BAPTA-AM no meio de incubação deve quelar todo conteúdo de Ca^{2+} intracelular o que deve inibir além da via proteolítica Ca^{2+} -dependente (ALTAEVA *et al.*, 2010), as vias proteassomal (ALLAMAN-PILLET *et al.*, 2003; MENCONI *et al.*, 2004; NAYAK; KUMAR; DASH, 2011) e autofágica (JIN *et al.*, 2016; SANSA *et al.*, 2023), indicando um efeito anti-proteolítico preponderante do BAPTA-AM em músculos co-incubados com WAY e portanto, a ideia de que a elevação do Ca^{2+} intracelular esteja realmente contribuindo na via de sinalização do OTR não foi descartada neste estudo.

Para melhor entender os achados descritos acima, optou-se por bloquear somente o efluxo deste cátion a partir do retículo sarcoplasmático mediado pelos IP3R os quais são canonicamente ativados pelos GPCR acoplados à $\text{G}\alpha_q$ (DEVOST; WRZAL; ZINGG, 2008). Os resultados apontaram que o 2-APB bloqueou a diminuição da proteólise induzida pelo WAY sendo este efeito associado com a inibição da atividade da PKC, da fosforilação da Akt e FoxO1 e elevação no conteúdo de LC3I e LC3II. De fato foi previamente demonstrado que o 2-APB diminuiu a concentração de Ca^{2+} intracelular (LANNER *et al.*, 2006), elevou a atividade proteolítica em células musculares esqueléticas (ZHU *et al.*, 2011), diminui a fosforilação da Akt em células humanas MCF-7 (BILBAO; SANTILLÁN; BOLAND, 2010) e linfócitos B (ZENG *et al.*, 2020) e aumentou o fluxo autofágico e o conteúdo de LC3 em cardiomiócitos (WONG *et al.*, 2013). Dessa forma, é possível sugerir que o OTR está acoplado à $\text{G}\alpha_q$ aumentando a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para então ativar a Akt, inibir FoxO1 e consequentemente a autofagia em músculos *soleus* de ratas. Ademais, estes resultados também são corroborados pela demonstração que o WAY inibiu a proteólise lisossomal que foi associada à ativação da via de sinalização da Akt em *soleus* (COSTA *et al.*, 2021). Baseando-se nestes dados, posteriormente avaliou-se a

contribuição da Akt nos efeitos anti-proteolíticos induzidos pela estimulação do OTR musculoesquelético.

Como esperado, a inibição farmacológica da Akt pela triciribina completamente bloqueou a elevação na fosforilação da Akt e FoxO1 e a atenuação da proteólise e do conteúdo de LC3 induzidas pelo WAY, indicando que esta quinase está envolvida no efeito anti-catabólico no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratas. Uma vez que o 2-APB impediu a elevação no conteúdo de substratos fosforilados pela PKC e de p^{Ser473}-Akt produzida pelo WAY, é possível especular que a Akt seja ativada pela PKC (GRECO, 2006; WU *et al.*, 2009) após estimulação dos OTR musculoesqueléticos, *embora este não tenha sido um objetivo deste estudo*. Apesar disso, o papel da PKC na regulação do metabolismo proteico muscular é bastante controverso, uma vez que alguns trabalhos demonstraram que ela pode induzir aumento (SMITH; WYKE; TISDALE, 2004; WYKE; TISDALE, 2006) ou mesmo diminuição (MINETTI *et al.*, 2011; NAKASHIMA *et al.*, 2005) da proteólise muscular, assim não seria improvável que outras quinases que dependam do aumento de Ca²⁺ intracelular possam também mediar a ativação da Akt após estimulação do OTR em *soleus*, como por exemplo, a quinase dependente de cálcio-calmodulina (CaMK). De fato, LIU *et al.* (2022) demonstraram que a inibição farmacológica ou o silenciamento gênico da CaMK em células C2C12 bloqueou a elevação na fosforilação da Akt induzida pela contração muscular através de um modelo de estimulação elétrica *in vitro*.

7. CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste estudo indicam que o mecanismo pelo qual a OT exerce suas ações anti-catabólicas no metabolismo de proteínas em músculo esquelético oxidativo é mediado pelo efluxo de Ca^{2+} através de receptores ionotrópicos ativados pelo IP3 presentes no retículo sarcoplasmático, os quais são provavelmente regulados pelo acoplamento entre o OTR e à proteína G α q. Também indicam a existência de uma sinalização intracelular cruzada entre o Ca^{2+} e a via da Akt/FoxO, a qual é considerada a principal responsável pela inibição da proteólise muscular. Ademais, tais resultados fortalecem o papel da OT na regulação do metabolismo muscular e fortalece os dados clínicos e experimentais que indicam ação anti-diabetogênica deste neuropeptídeo que pode ser justificada, pelo menos parcialmente, através da manutenção da massa musculoesquelética.

REFERÊNCIAS

- ALDERTON, J. M.; STEINHARDT, R. A. Calcium Influx through Calcium Leak Channels Is Responsible for the Elevated Levels of Calcium-dependent Proteolysis in Dystrophic Myotubes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9452–9460, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9452>
- ALLAMAN-PILLET, N.; STØRLING, J.; OBERSON, A.; RODUIT, R.; NEGRI, S.; SAUSER, C.; NICOD, P.; BECKMANN, J. S.; SCHORDERET, D. F.; MANDRUP-POULSEN, T.; BONNY, C. Calcium- and Proteasome-dependent Degradation of the JNK Scaffold Protein Islet-brain 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 49, p. 48720–48726, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M306745200>
- ALTAEVA, E. G.; LYSENKO, L. A.; KANTSEROVA, N. P.; NEMOVA, N. N.; SHENKMAN, B. S. The basal calcium level in fibers of the rat soleus muscle under gravitational unloading: The mechanisms of its increase and the role in calpain activation. **Doklady Biological Sciences**, v. 433, n. 1, p. 241–243, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0012496610040010>
- ALVISI, M.; DE ARCANGELIS, V.; CICCONE, L.; PALOMBI, V.; ALESSANDRINI, M.; NEMOZ, G.; MOLINARO, M.; ADAMO, S.; NARO, F. V1a vasopressin receptor expression is modulated during myogenic differentiation. **Differentiation**, v. 76, n. 4, p. 371–380, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00231.x>
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; RUGINSK, S. G.; MECAWI, A. S.; MARGATHO, L. O.; REIS, W. L.; VENTURA, R. R.; DA SILVA, A. L.; VILHENA-FRANCO, T.; ELIAS, L. L. K. **Neuroendocrinology of Hydromineral Homeostasis**. [S. l.: s. n.]. E-book. Disponível em: <https://doi.org/24829997>
- ARMSTRONG, W. E. Hypothalamic Supraoptic and Paraventricular Nuclei. In: **The Rat Nervous System: Fourth Edition**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2015. p. 295–314. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00014-0>
- BAVIERA, A. M.; ZANON, N. M.; CARVALHO NAVEGANTES, L. C.; MIGLIORINI, R. H.; DO CARMO KETTELHUT, I. Pentoxifylline inhibits Ca²⁺-dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. **American journal of physiology. Endocrinology and**

- metabolism**, v. 292, p. E702–E708, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00147.2006>
- BAVIERA, A. M.; ZANON, N. M.; NAVEGANTES, L. C. C.; KETTELHUT, I. C. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 315, n. 1–2, p. 104–112, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.09.028>
- BERIO, E.; DIVARI, S.; STARVAGGI CUCUZZA, L.; BIOLATTI, B.; CANNIZZO, F. T. 17 β -estradiol upregulates oxytocin and the oxytocin receptor in C2C12 myotubes. **PeerJ**, v. 5, p. e3124, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.3124>
- BERTAGGIA, E.; COLETTI, L.; SANDRI, M. Posttranslational modifications control FoxO3 activity during denervation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 302, n. 3, p. C587–C596, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00142.2011>
- BILBAO, P. S.; SANTILLÁN, G.; BOLAND, R. ATP stimulates the proliferation of MCF-7 cells through the PI3K/Akt signaling pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 499, n. 1–2, p. 40–48, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.001>
- BODINE, S. C. *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5547, p. 1704–1708, 2001 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1065874>
- BODINE, S. C.; BAEHR, L. M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 6, p. E469–E484, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2014>
- BODINE, S. C.; STITT, T. N.; GONZALEZ, M.; KLINE, W. O.; STOVER, G. L.; BAUERLEIN, R.; ZLOTCHENKO, E.; SCRIMGEOUR, A.; LAWRENCE, J. C.; GLASS, D. J.; YANCOPOULOS, G. D. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 11, p. 1014–1019, 2001 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncb1101-1014>
- BONALDO, P.; SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy.

- Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 1, p. 25–39, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dmm.010389>
- BRENNESVIK, E. O.; KTORI, C.; RUZZIN, J.; JEBENS, E.; SHEPHERD, P. R.; JENSEN, J. Adrenaline potentiates insulin-stimulated PKB activation via cAMP and Epac: Implications for cross talk between insulin and adrenaline. **Cellular Signalling**, v. 17, n. 12, p. 1551–1559, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.03.011>
- BRETON, C.; HAENGGEI, C.; BARBERIS, C.; HEITZ, F.; BADER, C. R.; BERNHEIM, L.; TRIBOLLET, E. Presence of functional oxytocin receptors in cultured human myoblasts. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 87, n. 3, p. 1415–8, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/jcem.87.3.8537>
- BÜSCHER, U. Effects of oxytocin receptor antagonist atosiban on pregnant myometrium in vitro. **Obstetrics & Gynecology**, v. 98, n. 1, p. 117–121, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0029-7844\(01\)01405-3](https://doi.org/10.1016/S0029-7844(01)01405-3)
- CAMERINO, C. The Long Way of Oxytocin from the Uterus to the Heart in 70 Years from Its Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2556, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24032556>
- CARRASCO, M. A.; RIVEROS, N.; RÍOS, J.; MÜLLER, M.; TORRES, F.; PINEDA, J.; LANTADILLA, S.; JAIMOVICH, E. Depolarization-induced slow calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 284, n. 6, p. C1438–C1447, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00117.2002>
- CHEN, J. *et al.* Mechanism of reduced muscle atrophy via ketone body (D)-3-hydroxybutyrate. **Cell and Bioscience**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00826-2>
- CHERRA, S. J.; KULICH, S. M.; UECHI, G.; BALASUBRAMANI, M.; MOUNTZOURIS, J.; DAY, B. W.; CHU, C. T. Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. **Journal of Cell Biology**, v. 190, n. 4, p. 533–539, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.201002108>
- CHIODERA, P.; COIRO, V.; CAMELLINI, L.; ROSSI, G.; PIGNATTI, D.; VOLPI, R.; ROTI, E. Effect of Pharmacological Doses of Oxytocin on Insulin Response to Glucose in Normal Man. **Hormone Research**, v. 20, n. 2, p. 150–154, 1984.

- Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000179988>
- CICUTTI, N. J.; SMYTH, C. E.; ROSAEG, O. P.; WILKINSON, M. Oxytocin receptor binding in rat and human heart. **The Canadian journal of cardiology**, v. 15, n. 11, p. 1267–73, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10579742>
- COSTA, A.; TOSCHI, A.; MURFUNI, I.; PELOSI, L.; SICA, G.; ADAMO, S.; SCICCHITANO, B. M. Local Overexpression of V1a-Vasopressin Receptor Enhances Regeneration in Tumor Necrosis Factor-Induced Muscle Atrophy. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–14, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/235426>
- COSTA, D. M. *et al.* Oxytocin induces anti-catabolic and anabolic effects on protein metabolism in the female rat oxidative skeletal muscle. **Life Sciences**, v. 279, n. April, p. 119665, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119665>
- DEING, V.; ROGGENKAMP, D.; KÜHNEL, J.; GRUSCHKA, A.; STÄB, F.; WENCK, H.; BÜRKLE, A.; NEUFANG, G. Oxytocin modulates proliferation and stress responses of human skin cells: Implications for atopic dermatitis. **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 6, p. 399–405, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/exd.12155>
- DEJAGER, N.; HUDSON, N. J.; REVERTER, A.; WANG, Y.-H.; NAGARAJ, S. H.; CAFE, L. M.; GREENWOOD, P. L.; BARNARD, R. T.; KONGSUWAN, K. P.; DALRYMPLE, B. P. Chronic exposure to anabolic steroids induces the muscle expression of oxytocin and a more than fiftyfold increase in circulating oxytocin in cattle. **Physiological Genomics**, v. 43, n. 9, p. 467–478, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00226.2010>
- DEVAL, C.; MORDIER, S.; OBÇLED, C.; BECHET, D.; COMBARET, L.; ATTAIX, D.; FERRARA, M. Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p. 143, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600143>
- DEVOST, D.; WRZAL, P.; ZINGG, H. H. Oxytocin receptor signalling. **Progress in Brain Research**, v. 170, n. 514, p. 167–176, 2008. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00415-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00415-9)

- DUVIGNEAUD, V.; RESSLER, C.; SWAN, J. M.; ROBERTS, C. W.; KATSOYANNIS, P. G. The Synthesis of Oxytocin 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, n. 12, p. 3115–3121, 1954. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja01641a004>
- DUVIGNEAUD, V.; RESSLER, C.; TRIPPETT, S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 205, n. 2, p. 949–957, 1953. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)49238-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)49238-1)
- EBERT, S. M.; AL-ZOUGBI, A.; BODINE, S. C.; ADAMS, C. M. Skeletal Muscle Atrophy: Discovery of Mechanisms and Potential Therapies. **Physiology**, v. 34, n. 4, p. 232–239, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physiol.00003.2019>
- ELABD, C.; COUSIN, W.; UPADHYAYULA, P.; CHEN, R. Y.; CHOOLJIAN, M. S.; LI, J.; KUNG, S.; JIANG, K. P.; CONBOY, I. M. Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 4082, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms5082>
- ERKANLI, K.; ERKANLI SENTURK, G.; AYDIN, U.; ARBAK, S.; ERCAN, F.; TUNCDEMIR, M.; ISIKSACAN, N.; BAKIR, I. Oxytocin protects rat skeletal muscle against ischemia/reperfusion injury. **Annals of Vascular Surgery**, v. 27, n. 5, p. 662–670, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2012.10.012>
- ESPINOZA, S. E.; LEE, J. L.; WANG, C.-P.; GANAPATHY, V.; MACCARTHY, D.; PASCUCCHI, C.; MUSI, N.; VOLPI, E. Intranasal Oxytocin Improves Lean Muscle Mass and Lowers LDL Cholesterol in Older Adults with Sarcopenic Obesity: A Pilot Randomized Controlled Trial. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 22, n. 9, p. 1877- 1882.e2, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2021.04.015>
- ESSID, S.; BEVINGTON, A.; BRUNSKILL, N. Proinsulin C-Peptide Enhances Cell Survival and Protects against Simvastatin-Induced Myotoxicity in L6 Rat Myoblasts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1654, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20071654>
- EZRAILSON, E. G.; ENTMAN, M. L.; GARBER, A. J. Adrenergic and serotonergic

- regulation of skeletal muscle metabolism in rat. I. The effects of adrenergic and serotonergic antagonists on the regulation of muscle amino acid release, glycogenolysis, and cyclic nucleotide levels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 20, p. 12494–12498, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44203-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44203-7)
- FERDOWSI, P. V.; AHUJA, K. D. K.; BECKETT, J. M.; MYERS, S. Capsaicin and Zinc Promote Glucose Uptake in C2C12 Skeletal Muscle Cells through a Common Calcium Signalling Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 2207, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23042207>
- FLORIAN, M.; JANKOWSKI, M.; GUTKOWSKA, J. Oxytocin increases glucose uptake in neonatal rat cardiomyocytes. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 482–491, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2009-0624>
- FULKS, R. M.; LI, J. B.; GOLDBERG, A. L. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. **The Journal of biological chemistry**, v. 250, n. 1, p. 290–8, 1975. Disponível em: <https://doi.org/1141208>
- GAO, Z. Y.; DREWS, G.; HENQUIN, J. C. Mechanisms of the stimulation of insulin release by oxytocin in normal mouse islets. **Biochemical Journal**, v. 276, n. 1, p. 169–174, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj2760169>
- GARBER, A. J.; HARARI, Y.; ENTMAN, M. L. Cholinergic stimulation of alanine and glutamine formation and release from skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 21, p. 7918–7923, 1978.
- GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 629–683, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.629>
- GLASS, D. J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **Nature cell biology**, v. 5, n. 2, p. 87–90, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncb0203-87>
- GOLL, D. E.; NETI, G.; MARES, S. W.; THOMPSON, V. F. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0395>
- GOLL, D. E.; THOMPSON, V. F.; LI, H.; WEI, W.; CONG, J. The calpain system. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 731–801, 2003. Disponível em:

<https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002>

- GOMES, M. D.; LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; NAVON, A.; GOLDBERG, A. L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 25, p. 14440–14445, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.251541198>
- GONÇALVES, D. A. *et al.* Insulin/IGF1 signalling mediates the effects of β 2 -adrenergic agonist on muscle proteostasis and growth. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 2, p. 455–475, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12395>
- GONÇALVES, D. A. P. *et al.* Mechanisms Involved in 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate-Mediated Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System in Skeletal Muscle. **Endocrinology**, v. 150, n. 12, p. 5395–5404, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2009-0428>
- GONÇALVES, D. A. P. *et al.* Mechanisms involved in 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 150, n. 12, p. 5395–5404, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2009-0428>
- GONÇALVES, D. A.; SILVEIRA, W. a.; LIRA, E. C.; GRAÇA, F. A.; PAULA-GOMES, S.; ZANON, N. M.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. C. 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**, v. 302, n. 1, p. E123–E133, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00188.2011>
- GOODMAN, M. N. Interleukin-6 Induces Skeletal Muscle Protein Breakdown in Rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 205, n. 2, p. 182–185, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.3181/00379727-205-43695>
- GRACA, F. A.; GONCALVES, D. A. P.; SILVEIRA, W. A.; LIRA, E. C.; CHAVES, V. E.; ZANON, N. M.; GAROFALO, M. A. R.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. C. Epinephrine depletion exacerbates the fasting-induced protein breakdown in fast-twitch skeletal muscles. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 12, p. E1483–E1494, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00267.2013>

- GRECO, S. Protein kinase C (PKC)- /- mediate the PKC/Akt-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in MCF-7 cells stimulated by bradykinin. **Journal of Endocrinology**, v. 188, n. 1, p. 79–89, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1677/joe.1.06433>
- HALTER, J. B.; PFLUG, A. E. Effects of anesthesia and surgical stress on insulin secretion in man. **Metabolism**, v. 29, n. 11, p. 1124–1127, 1980. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(80\)90021-9](https://doi.org/10.1016/0026-0495(80)90021-9)
- HYE, S.; MACINTYRE, D. A.; HANYALOGLU, A. C.; BLANKS, A. M.; THORNTON, S.; BENNETT, P. R.; TERZIDOU, V. Molecular and Cellular Endocrinology The oxytocin receptor antagonist , Atosiban , activates pro-in fl ammatory pathways in human amnion via G a i signalling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 420, p. 11–23, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.11.012>
- IANCU, R. V.; JONES, S. W.; HARVEY, R. D. Compartmentation of cAMP Signaling in Cardiac Myocytes: A Computational Study. **Biophysical Journal**, v. 92, n. 9, p. 3317–3331, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.095356>
- JAGOE, R. T.; LECKER, S. H.; GOMES, M.; GOLDBERG, A. L. Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 13, p. 1697–1712, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.02-0312com>
- JANKOWSKI, M.; HAJJAR, F.; KAWAS, S. AI; MUKADDAM-DAHER, S.; HOFFMAN, G.; MCCANN, S. M.; GUTKOWSKA, J. Rat heart: A site of oxytocin production and action. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 24, p. 14558–14563, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14558>
- JEFFERSON, L. S.; LI, J. B.; RANNELS, S. R. Regulation by insulin of amino acid release and protein turnover in the perfused rat hemicorpus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 4, p. 1476–1483, 1977. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)40681-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40681-8)
- JIN, Y.; BAI, Y.; NI, H.; QIANG, L.; YE, L.; SHAN, Y.; ZHOU, M. Activation of autophagy through calcium-dependent AMPK/mTOR and PKCθ pathway causes activation of rat hepatic stellate cells under hypoxic stress. **FEBS Letters**, v.

- 590, n. 5, p. 672–682, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12090>
- KATTE, T. A.; KASSIOU, M. A patent review of oxytocin receptor antagonists 2013–2017. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 12, p. 1287–1290, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1379992>
- KETTELHUT, I. C.; PEPATO, M. T.; MIGLIORINI, R. H.; MEDINA, R.; GOLDBERG, A. L. Regulation of different proteolytic pathways in skeletal muscle in fasting and diabetes mellitus. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 27, n. 4, p. 981–93, 1994. Disponível em: <https://doi.org/8087098>
- KETTELHUT, I. C.; WING, S. S.; GOLDBERG, A. L. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. **Diabetes / Metabolism Reviews**, v. 4, n. 8, p. 751–772, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dmr.5610040805>
- KLINE, W. O.; PANARO, F. J.; YANG, H.; BODINE, S. C. Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 102, n. 2, p. 740–747, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00873.2006>
- KONGSUWAN, K.; KNOX, M. R.; ALLINGHAM, P. G.; PEARSON, R.; DALRYMPLE, B. P. The effect of combination treatment with trenbolone acetate and estradiol-17?? on skeletal muscle expression and plasma concentrations of oxytocin in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 43, n. 1, p. 67–73, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2012.02.004>
- LANNER, J. T.; KATZ, A.; TAVI, P.; SANDSTRÖM, M. E.; ZHANG, S.-J.; WRETMAN, C.; JAMES, S.; FAUCONNIER, J.; LÄNNERGREN, J.; BRUTON, J. D.; WESTERBLAD, H. The Role of Ca²⁺ Influx for Insulin-Mediated Glucose Uptake in Skeletal Muscle. **Diabetes**, v. 55, n. 7, p. 2077–2083, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db05-1613>
- LAUTHERBACH, N.; GONÇALVES, D. A. P.; SILVEIRA, W. A.; PAULA-GOMES, S.; VALENTIM, R. R.; ZANON, N. M.; PEREIRA, M. G.; MIYABARA, E. H.; NAVEGANTES, L. C. C.; KETTELHUT, I. C. Urocortin 2 promotes hypertrophy and enhances skeletal muscle function through cAMP and insulin/IGF-1 signaling pathways. **Molecular Metabolism**, v. 60, p. 101492, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101492>

- LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; GILBERT, A.; GOMES, M.; BARACOS, V.; BAILEY, J.; PRICE, S. R.; MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 1, p. 39–51, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.03-0610com>
- 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. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 1S Suppl, p. 227S–237S, 1999.
- LEE, E. S.; UHM, K. O.; LEE, Y. M.; KWON, J.; PARK, S. H.; SOO, K. H. Oxytocin stimulates glucose uptake in skeletal muscle cells through the calcium-CaMKK-AMPK pathway. **Regulatory Peptides**, v. 151, n. 1–3, p. 71–74, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2008.05.001>
- LIGHT, A.; DU VIGNEAUD, V. On the Nature of Oxytocin and Vasopressin from Human Pituitary. **Experimental Biology and Medicine**, v. 98, n. 4, p. 692–696, 1958. Disponível em: <https://doi.org/10.3181/00379727-98-24154>
- LIRA, E. C.; GONÇALVES, D. A. P.; PARREIRAS-E-SILVA, L. T.; ZANON, N. M.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. C. Phosphodiesterase-4 inhibition reduces proteolysis and atrogenes expression in rat skeletal muscles. **Muscle & Nerve**, v. 44, n. 3, p. 371–381, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mus.22066>
- LIRA, E. C.; GRACA, F. A.; GONCALVES, D. A. P.; ZANON, N. M.; BAVIERA, A. M.; STRINDBERG, L.; L??NNROTH, P.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. C. Cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase inhibitors reduce skeletal muscle protein catabolism in septic rats. **Shock**, v. 27, n. 6, p. 687–694, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31802e43a6>
- LIU, S.; ZHANG, J.; QI, R.; DENG, B.; NI, Y.; ZHANG, C.; NIU, W. CaMKII and Kalirin, a Rac1-GEF, regulate Akt phosphorylation involved in contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 610, p. 170–175, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.03.152>

- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. L.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- MACHADO, J.; MANFREDI, L. H.; SILVEIRA, W. A.; GONÇALVES, D. A. P.; LUSTRINO, D.; ZANON, N. M.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. Calcitonin gene-related peptide inhibits autophagic-lysosomal proteolysis through cAMP/PKA signaling in rat skeletal muscles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 72, p. 40–50, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.12.011>
- MACHADO, J.; SILVEIRA, W. A.; GONÇALVES, D. A.; SCHAVINSKI, A. Z.; KHAN, M. M.; ZANON, N. M.; DIAZ, M. B.; RUDOLF, R.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. α -Calcitonin gene-related peptide inhibits autophagy and calpain systems and maintains the stability of neuromuscular junction in denervated muscles. **Molecular Metabolism**, v. 28, p. 91–106, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.06.024>
- MANGMOOL, S.; KUROSE, H. Gi/o Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX). **Toxins**, v. 3, n. 7, p. 884–899, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins3070884>
- MAO, L.-M.; TANG, Q.; WANG, J. Q. Protein kinase C-regulated cAMP response element-binding protein phosphorylation in cultured rat striatal neurons. **Brain Research Bulletin**, v. 72, n. 4–6, p. 302–308, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.01.009>
- MECAWI, A. D. S.; RUGINSKY, S. G.; ELIAS, L. L. K.; VARANDA, W. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuroendocrine regulation of hydromineral homeostasis. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 3, p. 1465–1516, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cphy.c140031>
- MENCONI, M. J.; WEI, W.; YANG, H.; WRAY, C. J.; HASSELGREN, P.-O. Treatment of cultured myotubes with the calcium ionophore A23187 increases proteasome activity via a CaMK II-caspase-calpain-dependent mechanism. **Surgery**, v. 136, n. 2, p. 135–142, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.surg.2004.03.014>
- MINETTI, G. C. *et al.* $G\alpha_{i2}$ Signaling Promotes Skeletal Muscle Hypertrophy, Myoblast

- Differentiation, and Muscle Regeneration. **Science Signaling**, v. 4, n. 201, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002038>
- MORALES, M. G.; ABRIGO, J.; ACUÑA, M. J.; SANTOS, R. A.; BADER, M.; BRANDAN, E.; SIMON, F.; OLGUIN, H.; CABRERA, D.; CABELLO-VERRUGIO, C. Angiotensin-(1-7) attenuates disuse skeletal muscle atrophy in mice via its receptor, Mas. **Disease Models & Mechanisms**, v. 9, n. 4, p. 441–449, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dmm.023390>
- NAKASHIMA, K.; ISHIDA, A.; YAMAZAKI, M.; ABE, H. Leucine suppresses myofibrillar proteolysis by down-regulating ubiquitin–proteasome pathway in chick skeletal muscles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, n. 2, p. 660–666, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.138>
- NAVEGANTES, L. C. C.; RESANO, N. M. Z.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, Í. C. Catecholamines inhibit Ca²⁺-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through β 2 -adrenoceptors and cAMP. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 281, n. 3, p. E449–E454, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.281.3.E449>
- NAVEGANTES, L. C.; RESANO, N. M.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C. Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 277, n. 5 Pt 1, p. E883-9, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567016>
- NAVEGANTES, L. C.; RESANO, N. M.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 279, n. 3, p. E663–E668, 2000.
- NAYAK, M. K.; KUMAR, K.; DASH, D. Regulation of proteasome activity in activated human platelets. **Cell Calcium**, v. 49, n. 4, p. 226–232, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.02.005>
- NICHOLSON, H. D.; SWANN, R. W.; BURFORD, G. D.; WATHES, D. C.; PORTER, D. G.; PICKERING, B. T. Identification of oxytocin and vasopressin in the testis and in adrenal tissue. **Regulatory Peptides**, v. 8, n. 2, p. 141–146, 1984. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(84\)90169-1](https://doi.org/10.1016/0167-0115(84)90169-1)
- NING, H.; REN, H.; ZHAO, Y.; YIN, H.; GAN, Z.; SHEN, Y.; YU, Y. Targeting the DP2

- receptor alleviates muscle atrophy and diet-induced obesity in mice through oxidative myofiber transition. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 14, n. 1, p. 342–355, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcsm.13136>
- NUNES, E. A.; STOKES, T.; MCKENDRY, J.; CURRIER, B. S.; PHILLIPS, S. M. Disuse-induced skeletal muscle atrophy in disease and non-disease states in humans: mechanisms, prevention, and recovery strategies. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 322, n. 6, p. C1068–C1084, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00425.2021>
- OGAWARA, Y.; KISHISHITA, S.; OBATA, T.; ISAZAWA, Y.; SUZUKI, T.; TANAKA, K.; MASUYAMA, N.; GOTOH, Y. Akt Enhances Mdm2-mediated Ubiquitination and Degradation of p53. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21843–21850, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109745200>
- PALMA, C. De; MORISI, F.; CHELI, S.; PAMBIANCO, S.; CAPPELLO, V.; VEZZOLI, M.; MOGGIO, M.; RIPOLONE, M.; FRANCOLINI, M.; SANDRI, M. Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 3, p. e529-1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.72>
- PAULA-GOMES, S.; GONÇALVES, D.; BAVIERA, A.; ZANON, N.; NAVEGANTES, L.; KETTELHUT, I. Insulin Suppresses Atrophy- and Autophagy-related Genes in Heart Tissue and Cardiomyocytes Through AKT/FOXO Signaling. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 12, p. 849–855, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0033-1347209>
- PEPATO, M. T.; MIGLIORINI, R. H.; GOLDBERG, a L.; KETTELHUT, I. C. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. **The American journal of physiology**, v. 271, n. 2 Pt 1, p. E340-7, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00421-002-0768-0>
- REVERSI, A.; RIMOLDI, V.; MARROCCO, T.; CASSONI, P.; BUSSOLATI, G.; PARENTI, M.; CHINI, B. The Oxytocin Receptor Antagonist Atosiban Inhibits Cell Growth via a “Biased Agonist” Mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 16, p. 16311–16318, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M409945200>

- RING, R. H. *et al.* Receptor and behavioral pharmacology of WAY-267464, a non-peptide oxytocin receptor agonist. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 1, p. 69–77, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.07.016>
- SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 23, p. 160–170, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physiol.00041.2007>
- SANDRI, M. FOXOphagy path to inducing stress resistance and cell survival. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 786–788, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncb2550>
- SANDRI, M.; SANDRI, C.; GILBERT, A.; SKURK, C.; CALABRIA, E.; PICARD, A.; WALSH, K.; SCHIAFFINO, S.; LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 399–412, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00400-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00400-3)
- SANSA, A.; MIRALLES, M. P.; BELTRAN, M.; CELMA-NOS, F.; CALDERÓ, J.; GARCERA, A.; SOLER, R. M. ERK MAPK signaling pathway inhibition as a potential target to prevent autophagy alterations in Spinal Muscular Atrophy motoneurons. **Cell Death Discovery**, v. 9, n. 1, p. 113, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01409-x>
- SANTOS, R. A. S. *et al.* Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1432869100>
- SHERIFF, S.; JOSHI, R.; FRIEND, L. A.; JAMES, J. H.; BALASUBRAMANIAM, A. Ghrelin receptor agonist, GHRP-2, attenuates burn injury-induced MuRF-1 and MAFbx expression and muscle proteolysis in rats. **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1909–1913, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.06.029>
- SILVEIRA, W. A.; GONÇALVES, D. A.; GRAÇA, F. A.; ANDRADE-LOPES, A. L.; BERGANTIN, L. B.; ZANON, N. M.; GODINHO, R. O.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. C. C. Activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis: implications for sympathetic regulation. **Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 1, p. 11–

- 19, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01055.2013>
- SILVEIRA, W. A.; GONÇALVES, D. A.; MACHADO, J.; LAUTHERBACH, N.; LUSTRINO, D.; PAULA-GOMES, S.; PEREIRA, M. G.; MIYABARA, E. H.; SANDRI, M.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. cAMP-dependent protein kinase inhibits FoxO activity and regulates skeletal muscle plasticity in mice. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 9, p. 12946–12962, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.201902102RR>
- SMITH, H. J.; WYKE, S. M.; TISDALE, M. J. Role of protein kinase C and NF-κB in proteolysis-inducing factor-induced proteasome expression in C2C12 myotubes. **British Journal of Cancer**, v. 90, n. 9, p. 1850–1857, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601767>
- STEWART, R.; AKHMEDOV, D.; ROBB, C.; LEITER, C.; BERDEAUX, R. Regulation of SIK1 abundance and stability is critical for myogenesis. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1212676110>
- STRAKOVA, Z.; SOLOFF, M. S. Coupling of oxytocin receptor to G proteins in rat myometrium during labor: Gi receptor interaction. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 272, n. 5, p. E870–E876, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.272.5.E870>
- THONBERG, H.; FREDRIKSSON, J. M.; NEDERGAARD, J.; CANNON, B. A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via α1-adrenoceptors and protein kinase C activation. **Biochemical Journal**, v. 364, n. 1, p. 73–79, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj3640073>
- TONGE, D. P.; JONES, S. W.; PARR, T.; BARDSLEY, R.; DOHERTY, M.; MACIEWICZ, R. A. β2-Adrenergic agonist-induced hypertrophy of the quadriceps skeletal muscle does not modulate disease severity in the rodent meniscectomy model of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 4, p. 555–562, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.11.014>
- VAN HEES, H. W.; SCHELLEKENS, W.-J. M.; LINKELS, M.; LEENDERS, F.; ZOLL, J.; DONDEERS, R.; DEKHUIJZEN, P. R.; VAN DER HOEVEN, J. G.; HEUNKS, L. M. Plasma from septic shock patients induces loss of muscle protein. **Critical Care**, v. 15, n. 5, p. R233, 2011. Disponível em:

<https://doi.org/10.1186/cc10475>

- VENTADOUR, S.; ATTAIX, D. Mechanisms of skeletal muscle atrophy. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, n. 6, p. 631–635, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.bor.0000245731.25383.de>
- WAALKES, T. P.; UDENFRIEND, S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 50, n. 5, p. 733–736, 1957.
- WELCH, M. G.; MARGOLIS, K. G.; LI, Z.; GERSHON, M. D. Oxytocin regulates gastrointestinal motility, inflammation, macromolecular permeability, and mucosal maintenance in mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 307, n. 8, p. G848–G862, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00176.2014>
- WONG, A.; GRUBB, D. R.; COOLEY, N.; LUO, J.; WOODCOCK, E. A. Regulation of autophagy in cardiomyocytes by Ins(1,4,5)P₃ and IP₃-receptors. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 54, p. 19–24, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.10.014>
- WOOD, M. Effect of General Anesthesia on Modulation of Sympathetic Nervous System Function. In: [S. l.: s. n.]. p. 449–458. *E-book*. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60634-1](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60634-1)
- WU, D.; PENG, F.; ZHANG, B.; INGRAM, A. J.; KELLY, D. J.; GILBERT, R. E.; GAO, B.; KREPINSKY, J. C. PKC- β 1 Mediates Glucose-Induced Akt Activation and TGF- β 1 Upregulation in Mesangial Cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 3, p. 554–566, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1681/ASN.2008040445>
- WYATT, P. G.; ALLEN, M. J.; CHILCOTT, J.; FOSTER, A.; LIVERMORE, D. G.; MORDAUNT, J. E.; SCICINSKI, J.; WOOLLARD, P. M. Identification of potent and selective oxytocin antagonists. Part 1: indole and benzofuran derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 10, p. 1399–1404, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00159-2](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00159-2)
- WYKE, S. M.; TISDALE, M. J. Induction of protein degradation in skeletal muscle by a phorbol ester involves upregulation of the ubiquitin–proteasome proteolytic pathway. **Life Sciences**, v. 78, n. 25, p. 2898–2910, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.11.014>

- XIE, H.; ROTHSTEIN, T. L. Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element-binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig. **The Journal of Immunology**, v. 154, n. 4, p. 1717–1723, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.154.4.1717>
- ZAMIR, O.; HASSELGREN, P.-O.; HIGASHIGUCHI, T.; FREDERICK, J. A.; FISCHER, J. E. Tumour necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) induce muscle proteolysis through different mechanisms. **Mediators of Inflammation**, v. 1, n. 4, p. 247–250, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/S0962935192000371>
- ZENG, Q.; ZHOU, Z.; QIN, S.; YAO, Y.; QIN, J.; ZHANG, H.; ZHANG, R.; XU, C.; ZHANG, S.; HUANG, S.; CHEN, L. Rapamycin inhibits B-cell activating factor (BAFF)-stimulated cell proliferation and survival by suppressing Ca²⁺-CaMKII-dependent PTEN/Akt-Erk1/2 signaling pathway in normal and neoplastic B-lymphoid cells. **Cell Calcium**, v. 87, p. 102171, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102171>
- ZHANG, H.; WU, C.; CHEN, Q.; CHEN, X.; XU, Z.; WU, J.; CAI, D. Treatment of Obesity and Diabetes Using Oxytocin or Analogs in Patients and Mouse Models. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e61477, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061477>
- ZHANG, Z.; ZHAO, L. D.; JOHNSON, S. E.; RHOADS, M. L.; JIANG, H.; RHOADS, R. P. Oxytocin is involved in steroid hormone–stimulated bovine satellite cell proliferation and differentiation in vitro. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 66, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2018.07.003>
- ZHAO, J.; BRAULT, J. J.; SCHILD, A.; CAO, P.; SANDRI, M.; SCHIAFFINO, S.; LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L. FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 6, p. 472–483, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.004>
- ZHOU, X. B.; LUTZ, S.; STEFFENS, F.; KORTH, M.; WIELAND, T. Oxytocin receptors differentially signal via G_q and G_i proteins in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes: Implications for myometrial contractility. **Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 3, p. 740–752, 2007. Disponível em:

<https://doi.org/10.1210/me.2006-0220>

ZHU, H.; BHATTACHARYYA, B. J.; LIN, H.; GOMEZ, C. M. Skeletal Muscle IP₃ R₁ Receptors Amplify Physiological and Pathological Synaptic Calcium Signals. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 43, p. 15269–15283, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3766-11.2011>

APÊNDICE

Material de divulgação do estudo nas mídias sociais do PROCFIS:





Título do trabalho:

**MECANISMOS INTRACELULARES
ENVOLVIDOS NA RESPOSTA ANTI-
PROTEOLÍTICA DA ESTIMULAÇÃO
OCITOCINÉRGICA EM MÚSCULOS
ESQUELÉTICOS DE RATAS**

Discente: Tatiane de Oliveira Santos
Orientador: Prof. Dr. Danilo Lustrino



PROCFIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



Neste estudo, demonstrou-se que a ocitocina protege o músculo esquelético diminuindo a quebra de suas proteínas estruturais o que pode resultar em hipertrofia muscular. O mecanismo pelo qual a ocitocina realiza esta função depende da elevação na concentração de cálcio dentro da célula muscular e da interação destes íon com a via de sinalização mediada pelas proteínas Akt/FoxO, as quais são protetoras da massa muscular esquelética e classicamente ativadas pela insulina. Esses resultados reforçam o papel da ocitocina na regulação do metabolismo muscular e fornecem apoio as evidências de que ela pode ter efeitos benéficos contra o diabetes, visto que ajuda a manter a massa muscular esquelética.

<http://www.posgraduacao.ufs.br/procfis>

ANEXO



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal de Sergipe
Coordenação de Pesquisa
Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA)

CERTIFICADO

2ª via

Certificamos que a proposta intitulada "**PAPEL DA OCITOCINA NO METABOLISMO DE PROTEÍNAS EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE RATOS**", registrada com o nº **62/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Danilo Lustrino Borges** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de **19/12/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 03/2018, Término: 02/2022
Espécie/linhagem/raça	Ratas Heterogênicas Wistar
Nº de animais	328
Peso/Idade	60-90g / 25-35 dias
Sexo	F
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS.



Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
Coordenador do CEPA/UFS