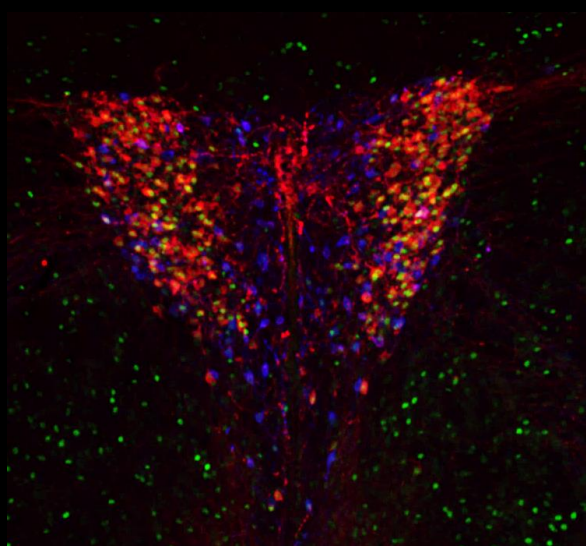




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

JOÃO DA CRUZ FILHO

**REPERCUSSÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELA
PRIVAÇÃO HÍDRICA EM CAMUNDONGOS E O PAPEL DA
SINALIZAÇÃO OCITOCINÉRGICA NA MANUTENÇÃO DA
MASSA MUSCULAR**



SÃO CRISTÓVÃO / SE
2024

JOÃO DA CRUZ FILHO	REPERCUSSÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELA PRIVAÇÃO HIDRICA EM CAMUNDONGOS E O PAPEL DA SINALIZAÇÃO OCITOCINÉRGICA NA MANUTENÇÃO DA MASSA MUSCULAR	2024

JOÃO DA CRUZ FILHO

**REPERCUSSÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELA
PRIVAÇÃO HÍDRICA EM CAMUNDONGOS E O PAPEL DA
SINALIZAÇÃO OCITOCINÉRGICA NA MANUTENÇÃO DA
MASSA MUSCULAR**

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

Co-orientador: Prof. Dr. André de Souza Mecawi

SÃO CRISTÓVÃO

2024

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

C957r Cruz Filho, João da
Repercussões metabólicas induzidas pela privação hídrica em camundongos e o papel da sinalização ocitocinérgica na manutenção da massa muscular / João da Cruz Filho ; orientador Danilo Lustrino Borges. – São Cristóvão, SE, 2024.
91 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Metabolismo energético - Desidratação. 2. Músculos - Metabolismo. 3. Ocitocina. 4. Proteólise. I. Borges, Danilo Lustrino, orient. II. Título.

CDU 612.73/.74.015.3

JOÃO DA CRUZ FILHO

**REPERCUSSÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELA
PRIVAÇÃO HÍDRICA EM CAMUNDONGOS E O
PAPEL DA SINALIZAÇÃO OCITOCINÉRGICA NA
MANUTENÇÃO DA MASSA MUSCULAR**

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 (DFS/CCBS/UFS)

Prof. Dr. Dawit Albieiro Pinheiro Gonçalves (EEFFTO/UFG)

Prof. Dr. Fernando de Azevedo Cruz Seara (IBCCF/UFRJ)

AGRADECIMENTOS

A Deus trino, Todo-Poderoso, que em sua soberana vontade me trouxe exatamente onde devo estar, para Sua própria glória.

À minha família, responsável pelo meu desenvolvimento pessoal e pelo constante estímulo aos meus estudos.

Ao meu “pai”, quer dizer, orientador, Danilo Lustrino. Nos próximos quatro anos, muito chão ainda há de ser escrito. Portanto, guardarei os maiores devidos agradecimentos para a tese de doutorado. Por enquanto, meu muito obrigado.

À e(x)quipe do Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental (LANBAC): Raquel Prado, Tatiane Oliveira, Hevely Anjos e, especialmente, à Daniely Messias. Como diz Clarice Falcão em sua música “Capitão Gancho”, “se não fossem as malas cheias de memórias, ou aquela história que faz mais de um ano, eu não seria eu”.

Ao meu co-orientador, André Mecawi e sua equipe do Laboratório⁺ de Neuroendocrinologia Molecular (UNIFESP), em especial, à Naima Marciano, Marcelo Sales, Ana Beatriz Henrique e Roger Rodríguez, que colaboraram com a realização dos experimentos. E à equipe do laboratório “vizinho”, de Neuroendocrinologia do Estresse, representado na pessoa do Dr. Rodrigo Rorato. A vocês, meu mais sincero Bom dia!

À Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), por me acolher temporariamente no terceiro semestre de meu mestrado. Às técnicas do laboratório multiusuário 4 do Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR), Elizabeth Naomi e Caroline Romera pelo auxílio na utilização do microscópio confocal. Aos técnicos dos biotérios de experimentação, Marcos e Marcos. Ao Prof. Dr. Gus Schoorlemmer, pelo auxílio com a quantificação de sódio plasmático.

Aos colaboradores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Neusa Zanon e os professores Luiz Carlos Navegantes e Ísis do Carmo Kettelhut.

Aos colaboradores da Universidade Federal de Sergipe: inicialmente, à professora Rosilene Calazans, que cedeu os primeiros casais com os quais montamos nossa colônia com a linhagem C57BL/6; em seguida aos professores Waldecy de Lucca, Daniel Badauê e Enilton Camargo, que cederam espaços em seus biotérios para manutenção dos camundongos utilizados neste projeto; terceiramente, à equipe

do Laboratório de Enzimologia, especialmente à pessoa de Tamiris Carvalho, pelo auxílio nas análises mediante utilização de equipamentos.

Ao Centro de Laboratórios de Química Multiusuário (CLQM), em particular à técnica Dra. Roberta Menezes pelo auxílio nas análises.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelas contribuições nas disciplinas do mestrado, e ao próprio programa, pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos funcionários lotados no Departamento de Fisiologia, em especial aos secretários do PROCFIS Thais Souza e Luiz César, e à equipe de limpeza, Aldair, Ninha e Edivânia.

Aos professores Dra. Sandra Lauton-Santos (UFS), Dr. Fernando Cruz Seara (UFRJ) e Dr. Dawit Albiero (UFMG) pelas maravilhosas contribuições na banca de qualificação e/ou defesa.

Aos animais que contribuíram, com suas vidas, para a realização desta pesquisa, para o progresso e desenvolvimento da ciência, manutenção da saúde e para o meu desenvolvimento técnico-científico.

Aos meus gatos da UFS – tantos, que não ousarei nomeá-los todos – pelos simples miados e companhia desde o terminal de ônibus até porta do laboratório, literalmente. Aos que se foram, restam saudades.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo auxílio no formato de bolsa para o desenvolvimento e realização desta dissertação.

Enfim, à Universidade Federal de Sergipe pela oportunidade de realização do mestrado.

Resta-me esperar não ter esquecido ninguém.

Sing to me, oh poets,

Your final song.

The song of the end.

Storm & the brotherhood of mutants (2023), #3

Fim.

Mas o que é o fim para quem caminha no infinito?

O fim é só o começo.

Ramon Souza em “Luz la” (2021), por Calmará

RESUMO

REPERCUSSÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELA PRIVAÇÃO HÍDRICA EM CAMUNDONGOS E O PAPEL DA SINALIZAÇÃO OCITOCINÉRGICA NA MANUTENÇÃO DA MASSA MUSCULAR. João da Cruz Filho, Mestrado em Ciências Fisiológicas, UFS, São Cristóvão/SE, 2024.

A desidratação é definida como o déficit no volume corporal de água, consequente à ingestão inadequada de fluidos, seja de forma aguda ou crônica. É, portanto, um desafio à homeostase hidroeletrolítica. Sabe-se que a hidratação inadequada parece predispor a uma série de doenças crônicas e, ainda, ao prejuízo da função muscular, bem como à sarcopenia, que é a perda de massa muscular associada à senilidade. Além disso, contribui para uma série de alterações metabólicas e hidroeletrolíticas, recrutadas como mecanismos de compensação ao estresse osmótico. No entanto, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que contribuem para a adaptação do metabolismo sistêmico e muscular à desidratação. Por isso, o presente estudo (CEUA nº 4492070222) objetivou avaliar as repercussões metabólicas de um modelo de privação hídrica de 36 horas em camundongos C57BL/6 machos. Observou-se que a desidratação culminou em perda de massa corporal, hiporexia e hipernatremia, mas sem alteração no hematócrito. Esses achados foram acompanhados de hipoglicemia, hipercolesterolemia, aumento na atividade dos neurônios secretores de vasopressina e ocitocina nos núcleos supraóptico e paraventricular hipotalâmicos e, ainda, redução no quociente respiratório durante o último período noturno observado, sugerindo menor utilização de carboidratos para fornecimento de energia. Curiosamente, a perda de massa corporal não resultou em perda de massa no músculo soleus e, ainda, aumentou a massa do músculo extensor digital longo (EDL), sugerindo um mecanismo de adaptação e/ou resistência à desidratação. Apesar da não alteração em sua massa, os músculos soleus mostraram menor atividade da sinalização dependente de Akt, e maior atividade proteolítica total e proteassomal, independente dos marcadores de proteólise MuRF-1, p62 e LC3. Ademais, a sinalização ocitocinérgica, embora essencial em estados de desidratação, não parece ter contribuído para a manutenção da massa muscular, tendo em vista que a expressão do receptor para ocitocina e atividade da proteína quinase C, ativada por esse receptor, permaneceram constantes. Assim, o estudo destaca o potencial pró-catabólico decorrente da desidratação, associado à perda de conteúdo proteico muscular e de reserva energética sistêmica, com prejuízo à homeostase do metabolismo energético.

Descritores: desidratação; metabolismo energético; metabolismo muscular; ocitocina; proteólise.

ABSTRACT

WATER DEPRIVATION-INDUCED METABOLIC REPERCUSSIONS IN MICE AND THE ROLE OF OXYTOCINERGIC SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF MUSCLE MASS. João da Cruz Filho, Mestrado em Ciências Fisiológicas, UFS, São Cristóvão/SE, 2024.

Dehydration is referred as a deficit in total body water, consequently to inadequate acute and/or chronic fluid intake. It is, therefore, a challenge to hydroelectrolytic homeostasis. It is currently known that inadequate hydration seems to predispose many chronic diseases, and also loss of muscle function, as well as predisposing to sarcopenia, the loss of muscle mass associated with aging. Besides, dehydration contributes to a series of metabolic and hydroelectrolytic arrangements, recruited as compensatory mechanisms to compensate osmotic stress. Nevertheless, little is known about the precise molecular mechanisms involved in systemic and muscle metabolism adaptation to dehydration. Therefore, the present project (registered as nº 4492070222) aimed to evaluate the metabolic consequences of a 36 h water deprivation protocol in C57BL/6 male mice. It was seen that dehydration resulted in loss of body mass, hyporexia and hypernatremia, but with no alteration in the haematocrit. These findings were accompanied by hypoglycaemia, hypercholesterolemia, increased activity of vasopressinergic and oxytocinergic neurons in the supraoptic and paraventricular hypothalamic nuclei and a reduction in respiratory exchange ratio at the last nocturnal period observed, suggesting lesser carbohydrate recruitment as energy source. Curiously, loss of body mass was not accompanied by muscle mass loss in soleus but increased extensor digitorum longus (EDL) mass, suggesting an adaptation or resistance mechanism to dehydration. Despite absence of mass loss, soleus muscle suffered a reduction in the activity of Akt-dependent signalling pathway, accompanied by increased total and proteasomal proteolysis, which were independent of MuRF-1, p62 e LC3. Moreover, oxytocinergic signaling, despite being essential to a dehydrated state, does not seem to contribute to muscle mass maintenance, since the expression of its receptor and the activity of protein kinase C remained unchanged. Hence, this research enlightens the pro-catabolic potential of dehydration, associated with loss of both muscle protein content and systemic energy stores, compromising energy metabolism homeostasis.

Keywords: dehydration; energetic metabolism; muscle metabolism; oxytocin; proteolysis.

RESUMO À SOCIEDADE

REPERCUSSÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELA PRIVAÇÃO HÍDRICA EM CAMUNDONGOS E O PAPEL DA SINALIZAÇÃO OCITOCINÉRGICA NA MANUTENÇÃO DA MASSA MUSCULAR. João da Cruz Filho, Mestrado em Ciências Fisiológicas, UFS, São Cristóvão/SE, 2024.

A desidratação é uma causa de perturbação ao equilíbrio fisiológico em qualquer organismo vivo. Refere-se à diminuição na quantidade de água disponível no corpo e acontece quando não há ingestão apropriada de água, seja de forma aguda (pontual) ou crônica (repetidamente). Como consequência, a desidratação pode predispor a vários problemas de saúde a longo prazo, inclusive contribuir para a perda de massa muscular, principalmente à medida que envelhecemos. Além disso, a desidratação também causa mudanças no nosso metabolismo, ou seja, na forma como o organismo consome e produz energia para manter um estado de equilíbrio funcional. No presente estudo, utilizamo-nos de um modelo animal, privando camundongos de água por 36 horas a fim de observar as consequências metabólicas da desidratação nesse mamífero. Inicialmente, observamos que os camundongos desidratados apresentaram perda de massa corporal (peso) e comeram em menor quantidade, mas, ainda assim, tinham maior teor de sódio no sangue. Além disso, a glicemia dos animais diminuiu, houve um aumento no colesterol total sanguíneo e ainda maior secreção para o sangue dos hormônios antidiurético (vasopressina) e ocitocina. Os achados também indicavam que o organismo estava se utilizando tanto da reserva de gordura, quanto de carboidratos para obter da energia, já que os animais se alimentaram menos. Na verdade, é possível ainda que em se utilizando dessas moléculas, o corpo tenha sido capaz de produzir uma certa quantidade de água metabólica, numa tentativa de contrabalancear o déficit de volume sanguíneo decorrente da desidratação. Um ponto curioso é que apesar da perda de “peso”, os camundongos não apresentaram perda de massa nos músculos avaliados (chamados soleus e extensor digital longo, ou EDL), demonstrando que podem ter desenvolvido um mecanismo de adaptação. No entanto, mesmo sem perda de massa, os soleus mostraram sinais de maior quebra de proteínas. Além disso, a ocitocina, um hormônio que é importante em situações de desidratação para expelir o excesso de sódio através da urina, não pareceu contribuir para a manutenção da massa muscular nesse modelo. Em conjunto, esses dados indicam que a desidratação causa uma predominância de quebra de moléculas para obtenção de energia, diminuindo a reserva sistêmica e muscular e causando um prejuízo no metabolismo energético normal.

Palavras-chave: desidratação; metabolismo energético; metabolismo muscular; ocitocina; quebra de proteínas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Causas comuns de desidratação. Adaptado de (El-Sharkawy et al., 2015)	5
Tabela 2 – Lista de anticorpos utilizados para as marcações de western blotting	27
Tabela 3 – Lista de anticorpos utilizados para as marcações de imunofluorescência	30
Tabela 4 – Caracterização do efeito da desidratação sobre hematócrito e concentração plasmática de sódio em camundongos C57BL/6 machos	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática dos compartimentos de fluidos corporais, considerando um humano adulto de 70kg. Adaptado de (Lacey et al., 2019).	4
Figura 2 – Exemplos representativos de técnicas de monitoramento da hidratação. Adaptado de (Bennet et al., 2021).....	7
Figura 3 – Ilustração de corte encefálico sagital apresentando os principais núcleos e conexões em cérebro de rato relacionados à regulação neural da homeostase hidromineral. Adaptado de (Mecawi et al., 2015).	9
Figura 4 – Esquematização das principais respostas homeostáticas à desidratação hipertônica e isotônica. Adaptado de (Lacey et al., 2019).	10
Figura 5 – Representação simplificada da degradação proteica mediada pelo sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma (UPS). Adaptado de (Scicchitano et al., 2018).	19
Figura 6 – Representação do mecanismo molecular envolvido no processo de macroautofagia. Adaptado de (Glick et al., 2010).....	21
Figura 7 – Esquematização do delineamento experimental.	24
Figura 8 - Variação de massa corporal (a) e ingestão alimentar (b) em camundongos C57BL/6 machos submetidos a 36 horas de privação hídrica total (WD).	33
Figura 9 – Variação de massa corporal (a), ingestão alimentar (b) e ingestão hídrica (c) de camundongos C57BL/6 machos submetidos à privação hídrica (36 h).	35
Figura 10 – Quantificação de imunorreatividade para c-Fos em neurônios ocitocinérgicos (OT; a) e vasopressinérgicos (AVP; b) do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN).	38
Figura 11 – Quantificação de imunorreatividade para c-Fos em neurônios OT (a) e vasopressinérgicos (b) do núcleo supraóptico hipotalâmico (SON).....	39

Figura 12 – Estimativa de consumo médio de oxigênio (VO_2 ; a), produção de dióxido de carbono (VCO_2 ; b), quociente respiratório (QR; c) e calor (d) de camundongos C57BL/6 machos submetidos à privação hídrica (36 h). 41

Figura 13 – Estimativa média de VO_2 (a,b), VCO_2 (c,d), QR (e,f) e calor (g,h) nas primeiras 12h de dia (diurno) e 12 últimas horas de noite (noturno) no modelo de privação hídrica (36 h) em camundongos C57BL/6 machos. 44

Figura 14 – Índice de massa hepática e tecido adiposo branco retroperitoneal (rTAB) (a), além de glicemia e colesterol sérico (b) de camundongos C57BL/6 machos submetidos à privação hídrica (36 h). 47

Figura 15 – Massa relativa do músculo oxidativo soleus de camundongos C57BL/6 machos submetidos à privação hídrica (36 h). 51

Figura 16 – Efeito da privação hídrica de 36 h na taxa proteolítica total (a) e proteassomal (b) de músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos..53

Figura 17 – Efeito da privação hídrica (36 h) na síntese proteica em músculos soleus (a), mensurada pela incorporação de puromicina em proteínas recém-sintetizadas.....55

Figura 18 – Efeito da privação hídrica de 36h na expressão de isoformas fosforiladas das proteínas Akt e FoxO (a) em músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos.. 56

Figura 19 – Efeito da privação hídrica (36 h) na expressão de marcadores da via proteolítica dependente de ubiquitina-proteassoma, isto é, MuRF-1 e cadeias poli-ubiquitinadas (a) em músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos.. 57

Figura 20 – Efeito da privação hídrica (36 h) na expressão de marcadores da via autofágica-lisossomal (a) em músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos.. 58

Figura 21 – Efeito da privação hídrica (36 h) na expressão do canal de água aquaporina 4 (a) em músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos..59

Figura 22 – Efeito da incubação com o agonista para OTR, o WAY-267,464, em concentrações distintas sobre a proteólise total (a) e proteassomal (b) em músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos em situação basal. 61

Figura 23 – Efeito da privação hídrica (36 h) na expressão do receptor para ocitocina e substratos fosforilados para PKC (a) em músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos. 62

Figura 24 – Massa relativa do músculo glicolítico EDL de camundongos C57BL/6 machos submetidos à privação hídrica (36 h). 64

Figura 25 – Área de secção transversa do músculo tibial anterior (a) e distribuição do tamanho das fibras por frequência relativa percentual (b) em camundongos C57BL/6 machos submetidos à privação hídrica (36 h). 65

Figura 26 – Efeito da privação hídrica (36 h) na proteólise total em músculos EDL (a). 66

Figura 27 – Efeito da privação hídrica (36 h) na síntese proteica em músculos EDL (a). 67

Figura 28 – Efeito da privação hídrica (36 h) na expressão do canal de água aquaporina 4 (a) em músculo EDL obtido de camundongos C57BL/6 machos. 67

Figura 29 – Efeito da privação hídrica (36 h) na expressão do receptor para ocitocina (a) em músculo EDL obtido de camundongos C57BL/6 machos. 68

LISTA DE ABREVIATURAS

4-EBP1 proteína ligadora 1 do fator de iniciação da tradução eucariótica 4E

ACTH hormônio adenocorticotrófico

ADP adenosina difosfato

Akt proteína quinase B

AMP adenosina monofosfato

AMPK proteína quinase dependente de AMPc

ANOVA análise de variância

AP Área postrema

AP-1 proteína ativadora 1

AQP aquaporina

AST aspartato aminotransferase

Atg proteína relacionada à autofagia

ATP adenosina trifosfato

AVP arginina-vasopressina

BCAA aminoácidos de cadeia ramificada

C₂C₁₂ mioblastos imortalizados obtidos de camundongos

CaMKK proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina

CEPA Conselho de Ética em Pesquisa Animal

CK creatina quinase

cNTS porção caudal do núcleo do trato solitário

CSA área de secção transversa

E1 enzima ativadora de ubiquitina

E2 enzima carreadora de ubiquitina

E3 ubiquitina-ligase

EDL extensor digital longo

EiF4E fator de iniciação da tradução eucariótica 4E

FoxO Forkhead box O

GR receptor para glicocorticoides

GSK3-β glicogênio sintase quinase 3 beta
HDL lipoproteína de alta densidade
IP3 inositol trifosfato
LC3 microtubule-associated protein light chain 3
LDH lactato desidrogenase
LDL lipoproteína de baixa densidade
MAFbx proteína atrogina-1
ME músculo esquelético
mTORC1 complexo-alvo da rapamicina em mamíferos 1
MuRF-1 muscle RING Finger – 1
MVIC força máxima de contração isométrica muscular
OAP arranjo ortogonal de partículas
OT ocitocina
OTR receptor para ocitocina
p62 sequestrassomo 1 / proteína ligadora de ubiquitina p62
p70S6K proteína quinase da proteína S6 ribossomal
PE fosfatidiletanolamina
PEPCK fosfenolpiruvato carboxiquinase
PI3K fosfatidilinositol-3-quinase
PKC proteína quinase C
PVN núcleo paraventricular do hipotálamo
QR quociente respiratório
RNA_m RNA (ácido ribonucleico) mensageiro
rNTS porção rostral do núcleo do trato solitário
rTAB tecido adiposo branco retroperitoneal
SFO órgão subfornical
SNARE *soluble NSF attachment receptor*
SON núcleo supraóptico do hipotálamo
TSC2 complexo da esclerose tuberosa 2
ULK quinase ativadora de autofagia tipo Unc-51

UPS sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma

USG densidade urinária específica

V1a receptor para vasopressina do tipo 1a

VCO₂ produção de dióxido de carbono

VO₂ consumo de oxigênio

WD privação hídrica (do inglês, *water deprivation*) / privados de água

WGA wheat germ agglutinin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1. A água corporal e o déficit hídrico	3
2.2. Respostas neuroendócrinas à privação hídrica	8
2.3. Papel da ocitocina na regulação do metabolismo energético sistêmico e proteico muscular esquelético	10
2.4. Efeitos da desidratação no metabolismo energético	12
2.5. Efeitos da desidratação na função muscular esquelética	13
2.6. Mecanismos moleculares envolvidos na regulação do metabolismo proteico da musculatura esquelética	17
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo geral	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. METODOLOGIA	23
4.1. Animais	23
4.2. Ensaio <i>ex vivo</i> de estimativa de degradação proteica	25
4.3. Ensaio <i>in vivo</i> de estimativa de síntese proteica	26
4.4. Western blotting	26
4.5. Imunofluorescência	28
4.6. Calorímetro	30
4.7. Quantificações bioquímicas	31
4.8. Análise estatística	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Caracterização do modelo de desidratação induzido por privação hídrica de 36 h	32
5.2. Efeito da privação hídrica de 36 h no metabolismo energético sistêmico	40
5.3. Efeito da privação hídrica de 36 h no metabolismo proteico muscular	51
6. CONCLUSÃO	69
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICES	88
ANEXOS	91

1. INTRODUÇÃO

A água é um componente essencial à manutenção da vida. Mais que isso, a água é “vida” (Thomas et al., 2008). Sendo o principal constituinte da massa corporal, sua presença é essencial para a homeostase hidroeletrolítica, termorreguladora e metabólica. Entretanto, a desidratação, que, de forma simples, se refere à deficiência no conteúdo de água corporal, é muito subestimada, a despeito de ter uma prevalência considerável e aumentar os custos de manutenção de pacientes em serviços de saúde (Lacey et al., 2019). Há algum tempo, tem-se notado que o *status* de hidratação está intimamente relacionado também a alterações físicas e mentais, incluindo mudanças de humor, déficit cognitivo e perda de performance durante a prática de atividade física, seja de forma direta, ou indireta (Campa et al., 2020).

A desidratação também interfere na regulação da homeostase energética: indivíduos idosos submetidos à caminhada de alta intensidade em aclive durante 10 dias consecutivos desenvolveram desidratação progressiva, que foi acompanhada de recrutamento de lipídeos para degradação, causando aumento na circulação de ácidos graxos não esterificados (Ainslie et al., 2002). Já pacientes diabéticos (*diabetes mellitus* tipo I) desidratados parecem ter maior propensão ao desenvolvimento de hiperglicemia e hipercetonemia, sendo que a desidratação também é uma consequência da cetoacidose diabética e deve ser corrigida junto com o desequilíbrio glicêmico (Burge et al., 2001; Ugale et al., 2012). Outro achado interessante é que a simples ingestão de água em humanos é capaz de induzir a termogênese: homens e mulheres com massa corporal adequada apresentaram, depois de ingerir um volume de 0,5L de água após 12,5 h de jejum alimentar um aumento no gasto energético, que durou por até 60 min., acompanhado de maior degradação de carboidratos em mulheres e lipídeos em homens (Boschmann et al., 2003).

Dentre os tecidos de maior proporção corporal, o músculo esquelético (ME) destaca-se por ser composto por uma fração de até 76% de água, que colabora tanto para a manutenção da estrutura e função das proteínas miofibrilares, quanto para a atividade metabólica do tecido (Lorenzo et al., 2019). O ME é altamente plástico e o principal responsável pela manutenção da sensibilidade insulínica, chegando a consumir a maior parte da glicose circulante mesmo em estado basal (Narvaez-Sanchez et al., 2019). A importância da água para a sua manutenção fisiológica é suportada pela demonstração de que a redução na expressão proteica e de RNA

mensageiro (RNAm) de transportadores para água do tipo aquaporina 4 (AQP4) do sarcolema é associada ao desenvolvimento de miopatias, como a distrofia muscular de Duchenne em humanos (Wakayama et al., 2002). Essa ideia é também corroborada pela demonstração de que indivíduos senescentes que experimentam a sarcopenia, isto é, perda na massa muscular esquelética associada à senilidade, têm redução no conteúdo de água corporal, que é acompanhada de menor expressão de AQP4 (Kim et al., 2023; Yoo et al., 2018). Deste modo, o *status* de hidratação e o volume intracelular de água devem interferir diretamente no metabolismo energético e muscular esquelético (Boschmann et al., 2003; Hackney et al., 2012; Lorenzo et al., 2019).

Interessantemente, também durante a senescência há uma redução na concentração plasmática de ocitocina (OT), um hormônio produzido pelos neurônios magnocelulares dos núcleos supraóptico (SON) e paraventricular (PVN) hipotalâmicos e que é hipersecretado durante a desidratação (Vilhena-Franco et al., 2016). Dados experimentais demonstraram que enquanto a reposição com OT atenuou a atrofia muscular em camundongos senescentes, a deleção gênica desse hormônio acelerou a sarcopenia nesses animais, indicando que a OT é um regulador do metabolismo muscular. De fato, a OT participa ativamente do processo de miogênese e regeneração do tecido muscular esquelético (Elabd et al., 2014) e a estimulação dos receptores para OT (OTR), tanto *in vitro* quando *in vivo* promoveu atividade anticatabólica e/ou anabólica no metabolismo de proteínas do músculo esquelético, por meio do aumento da atividade da proteína quinase C (PKC) e de uma interação com a via de sinalização da proteína quinase B (Akt) (Santos et al., 2023), além da diminuição na atividade dos sistemas proteolíticos autofágico e dependente de ubiquitina-proteassoma (UPS) (Costa et al., 2021).

É sabido que um dos gatilhos para hipersecreção de OT, bem como da arginina-vasopressina (isto é, hormônio antidiurético, AVP), é a alteração no ambiente osmótico de ambos o SON e PVN, que pode ser causada pela desidratação (Coletti et al., 2015; Neumann et al., 1993). No entanto, é possível que a maior secreção de OT seja também uma resposta adaptativa ao estresse metabólico imposto pela desidratação, especialmente quando esta é acompanhada de hipernatremia decorrente da maior perda proporcional de fluido (Mecawi et al., 2015). Durante o estresse induzido pela hiperosmolalidade sanguínea, o organismo procura adaptar-se por meio de vários mecanismos, dentre os quais o aumento da expressão de genes

que codificam aquaporinas, em busca de facilitar a reabsorção renal de água, a ativação da autofagia direcionada a proteínas defeituosas e o rearranjo das proteínas do citoesqueleto para manutenção do volume celular (Christoph Kuper et al., 2007; Vom Dahl et al., 2001). Desse modo, o estresse hiperosmótico pode estar relacionado diretamente com o aumento da degradação proteica, a fim de reaproveitar aminoácidos, contribuindo para a sobrevivência da célula (Vom Dahl et al., 2001). Ainda assim, os mecanismos moleculares precisos envolvidos na resposta sistêmica e muscular esquelética frente à privação hídrica (WD) e a possível contribuição da sinalização ocitocinérgica na regulação do metabolismo energético durante a WD ainda permanecem obscuros. Portanto, objetivou-se neste trabalho realizar uma caracterização do efeito da privação hídrica de 36 h no metabolismo energético sistêmico e proteico muscular esquelético, avaliando, ainda, a possível contribuição da sinalização ocitocinérgica para a regulação destes durante a WD.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A água corporal e o déficit hídrico

A água é o principal componente do ser vivo. Todavia, o organismo é incapaz de obter toda a demanda hídrica dos alimentos sólidos úmidos, ou de produzir água em quantidade suficiente através de processos metabólicos. Por isso, faz-se necessária sua ingestão, o que torna a água um nutriente essencial (Jéquier & Constant, 2010). Através de mecanismos precisos de regulação, o volume total de água corpórea é adequadamente distribuído como fluido intracelular e extracelular, que, por sua vez, é ainda categorizado em espaço intravascular e intersticial (figura 1) (Lacey et al., 2019).

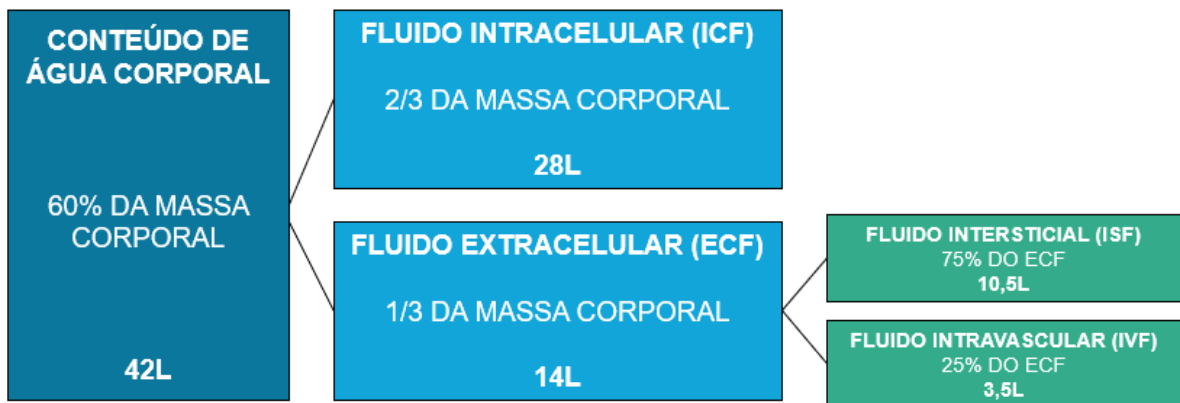


Figura 1 – Representação esquemática dos compartimentos de fluidos corporais, considerando um humano adulto de 70kg. Adaptado de (Lacey et al., 2019).

Por outro lado, a desidratação pode ser definida como o déficit no conteúdo corpóreo de água, o que pode ser resultado de uma menor ingestão hídrica ou, ainda, de incremento na perda de água, como acontece, por exemplo, durante quadros de vômito e diarreia. Um indivíduo adulto saudável pode experimentar desidratação desde quando perde uma massa corporal equivalente a “apenas” 1-3% como resultado da depleção de fluidos (Shaheen et al., 2018). Estudos prévios demonstram que diferentes taxas de desidratação são capazes de causar prejuízo em habilidades físicas e mentais, levando à perda de foco e memória, déficit cognitivo, menor força muscular, dentre outros (Benton et al., 2016; Gopinathan et al., 1988; Savoie et al., 2015). Além disso, em idosos, a desidratação é associada à maior taxa de mortalidade e pior prognóstico de doenças (Edmonds et al., 2021). De fato, observa-se que a desidratação diagnosticada na admissão hospitalar é associada à maior mortalidade em 30 dias, mesmo quando corrigindo por uma série de covariantes. Por isso, é associada ao aumento de custos para os sistemas de saúde (Edmonds et al., 2021).

A desidratação pode ser classificada, de acordo com sua etiologia, em (i) hipertônica, quando há maior perda de fluido em relação ao sódio, culminando num ambiente vascular hipernatrêmico; (ii) hipotônica, quando a proporção de sódio perdido é superior à de fluidos ou (iii) isotônica, em que a perda de fluidos e sódio é proporcional e, portanto, não associada a um aumento na osmolalidade do fluido extracelular (tabela 1) (El-Sharkawy et al., 2015; Lacey et al., 2019).

Tabela 1 – Causas comuns de desidratação. Adaptado de (El-Sharkawy et al., 2015)

Tipo de desidratação	Causas
Isotônica	• Queimaduras • Vômito (a depender dos eletrólitos perdidos) • Diarreia (a depender dos eletrólitos perdidos) • Ascite
Hipotônica	• Vômito (a depender dos eletrólitos perdidos) • Diarreia (a depender dos eletrólitos perdidos) • Deficiência adrenocortical • Insuficiência renal • Hiperglicemia persistente
Hipertônica	• Ingestão hídrica inadequada • Sudorese excessiva • <i>Diabetes insipidus</i> • Diuréticos de alça (e.g. furosemida) • Laxantes osmóticos

Frequentemente, o *status* de hidratação é subestimado ou desconsiderado pelas pessoas, embora a água seja o principal componente do organismo. Todavia, alterações na hidratação celular têm potencial para impactos de magnitude (Seal et al., 2019), já que a água participa de inúmeros processos fisiológicos, como a termorregulação, transporte de nutrientes através do sangue e reações metabólicas (Jéquier & Constant, 2010). Ainda assim, não há um consenso acerca da ingestão hídrica adequada diária para homens e mulheres. Relatos prévios sugerem valores que vão desde 2,5 a 3,7 L/dia para homens e 2,0 a 2,7 L/dia para mulheres, considerando a idade adulta (EFSA Panel on Dietetic Products, 2010; Shaheen et al., 2018).

Embora sejam considerados inespecíficos, são muitos os sinais clínicos associados à desidratação aguda. Vale ressaltar que estes podem variar, também, de acordo com a intensidade do déficit hídrico, incluindo desde fadiga, sonolência, menor débito urinário, dor de cabeça, fraqueza muscular, tontura e sede, até secura de membranas mucosas, olhos fundos, ausência de sudorese e anúria, hipotensão

arterial, taquicardia, febre, delírio e inconsciência (Jéquier & Constant, 2010). Um estudo retrospectivo realizado com dados de pacientes de um hospital universitário no Reino Unido observou que de 6632 pacientes idosos avaliados, 27% apresentavam desidratação hiperosmótica à admissão e, dentre os tais, 39% passaram por um quadro de insuficiência renal aguda. Assim, deve-se considerar que a desidratação possa estar diretamente associada ao desenvolvimento ou predisposição a doenças (El-Sharkawy et al., 2020).

Em particular, destaca-se a possível associação direta entre a desidratação e urolitíases, doença renal crônica, câncer colorretal, constipação funcional, cardiopatias crônicas, migrânea, *diabetes mellitus* tipo II, dentre outros (El-Sharkawy et al., 2015). Todavia, há fatores desafiantes que devem ser levados em consideração quando associados ao estado de hidratação e à incidência ou prognóstico de algumas doenças. Por exemplo, enquanto algumas destas podem desenvolver-se em horas a dias (e.g. diarreia), outras podem levar até anos (e.g. câncer). Além disso, avaliar o comportamento de ingestão de água pode ser extremamente desafiador, seja pelo número de participantes que seria necessário para uma amostragem fiel da população, ou pela desistência dos mesmos a longo prazo; e, ainda, pela improbabilidade de que os indivíduos observados mantenham por meses, anos ou ainda por toda a vida, o mesmo comportamento em relação à ingestão hídrica (Armstrong, 2012).

Sob uma perspectiva clínica, análises bioquímicas podem contribuir para o diagnóstico da desidratação, mas o contexto (e.g. repouso, exercício físico) deve sempre direcionar a escolha do avaliador: eletrólitos (principalmente o sódio), a osmolalidade urinária e plasmática, densidade específica urinária e, ainda, volume urinário são alguns dos parâmetros utilizados com maior frequência (figura 2) (Bennet et al., 2021; Muñoz et al., 2013). No entanto, mesmo quando identificado um quadro de desidratação crônica – constatado por pesquisa de hábitos, por exemplo –, especialmente em idosos, há certa relutância na correção do problema, uma vez que envolve mudança comportamental, de hábitos e, ainda de medos dos pacientes, que podem recriar a incontinência urinária (Frith, 2023).

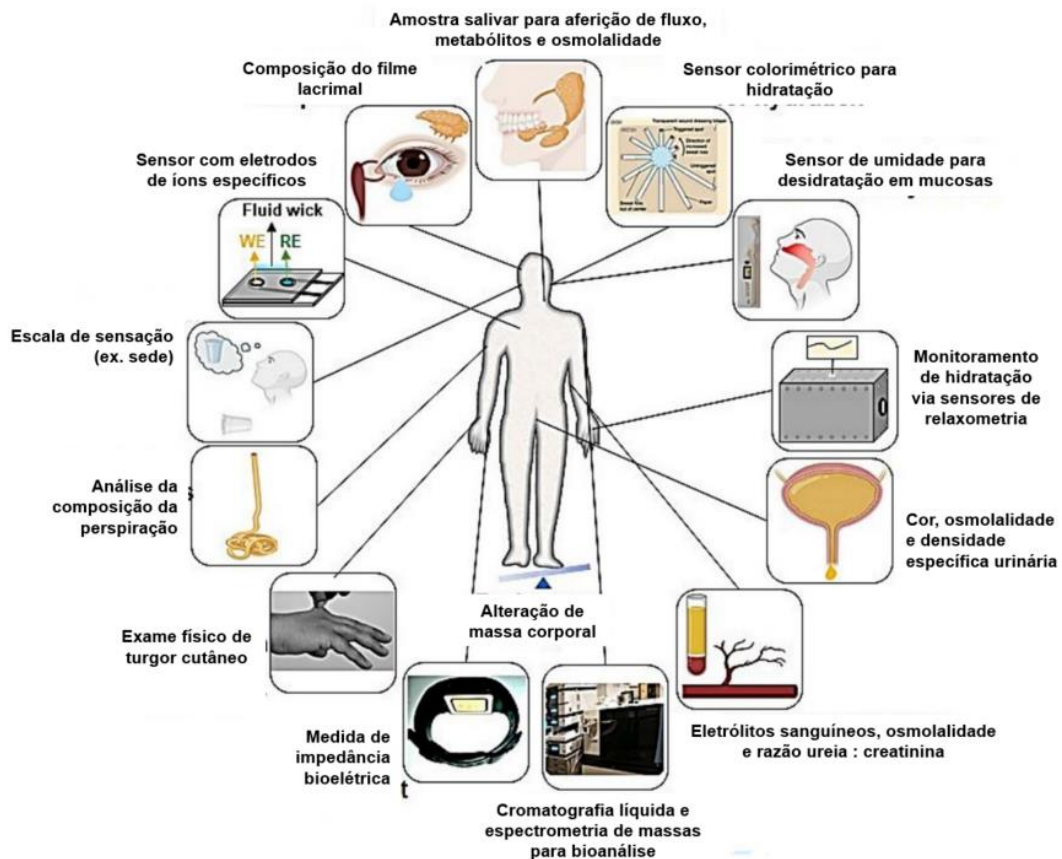


Figura 2 – Exemplos representativos de técnicas de monitoramento da hidratação. Adaptado de (Bennet et al., 2021).

Embora a desidratação esteja frequentemente associada a um prejuízo na saúde (Seal et al., 2019), também é um fenômeno que costuma acompanhar a prática do exercício físico prolongado, que não é uma condição patológica. Neste caso, a prática de atividade prolongada é responsável por promover alterações dinâmicas e complexas na regulação dos fluidos corporais: enquanto o aumento na pressão arterial sistólica é associado a um aumento na transição de fluidos do ambiente intravascular para o compartimento extravascular, o que também acontece como resultado do aumento na concentração de lactato, sódio, potássio e fosfato em tecidos periféricos ativos (e.g. o músculo), a maior pressão hidrostática nos músculos em contração e o maior fluxo linfático promovem o deslocamento do fluido intersticial para o ambiente intravascular. Assim, os fluidos se deslocam pelos compartimentos celulares de forma contínua. No entanto, a perda de fluido por meio da transpiração durante o exercício físico é um mecanismo essencial para a termorregulação e, portanto, costuma causar depleção de fluido (por perda de fluido hiposmótico) e, consequentemente, desidratação hipertônica (Périard et al., 2021).

2.2. Respostas neuroendócrinas à privação hídrica

Em geral, mamíferos estão constantemente sujeitos a alterações de volume circulante, bem como de tonicidade sanguínea. Esses fatores são diretamente influenciados pela ingestão de água e apetite por sódio, que, por sua vez, também os influenciam. Além disso, a excreção urinária de ambos os elementos é um componente primordial desta interação (Antunes-Rodrigues et al., 2004; J. Périard et al., 2012).

Dentre os componentes-chave responsáveis pela integração entre osmossensibilidade – obtida através de receptores sensíveis ao Na^+ e volume/pressão – e a regulação da homeostase hidromineral, encontra-se uma variedade de núcleos encefálicos, como os SON, PVN e órgãos circunventriculares (e.g. órgão subfornical - SFO, área postrema – AP, e porção anteroventral do terceiro ventrículo). Esses, quando estimulados, desempenham respostas que incluem a sensação de sede, apetite por sal e secreção de peptídeos vasopressores e natriuréticos (Antunes-Rodrigues et al., 2013). O SFO é responsivo à angiotensina II por meio de seus receptores AT1, que quando estimulados promovem a ingestão de sódio tanto em estados de hipovolemia quanto hiponatremia. Já a AP parece fazer parte de um circuito inibitório sobre o apetite por sódio, similarmente à porção rostral do núcleo do trato solitário (rNTS). Curiosamente, a porção caudal do mesmo núcleo (cNTS) exibe o efeito oposto, aumentando o apetite por sódio quando em situação de privação salina. Esse núcleo recebe aferentes diretamente do trato digestório, sendo ainda responsivo à aldosterona, que é um hormônio lipofílico e, portanto, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Em conjunto, esses circuitos regulam o apetite salino a fim de promover o balanço da homeostase hidromineral (figura 3) (Bernal et al., 2023).

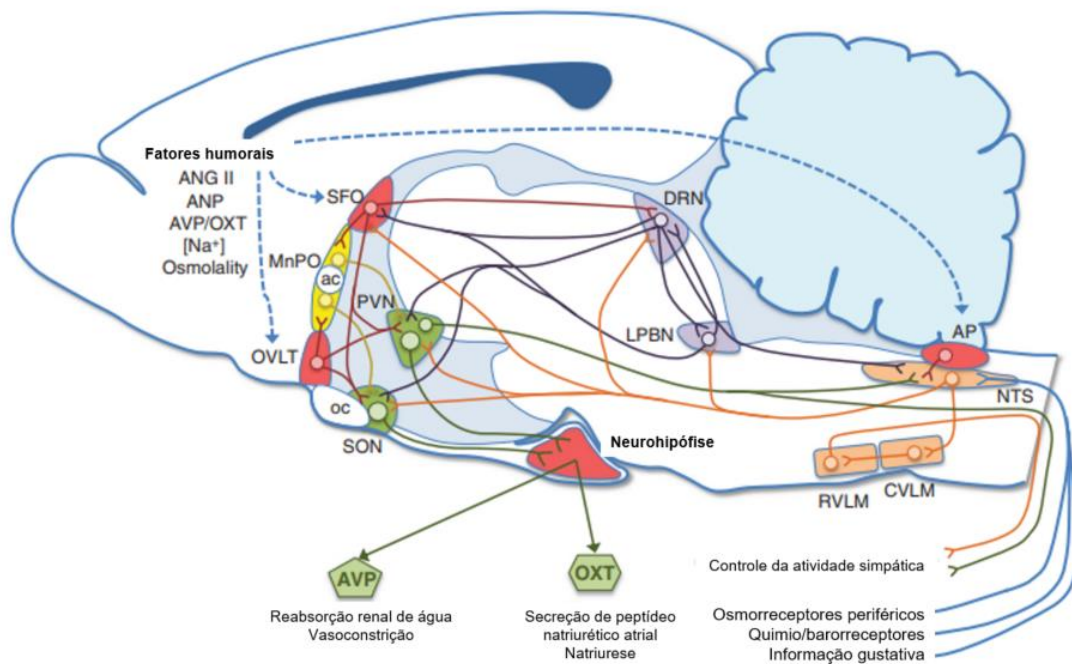


Figura 3 – Ilustração de corte encefálico sagital apresentando os principais núcleos e conexões em cérebro de rato relacionados à regulação neural da homeostase hidromineral. Adaptado de (Mecawi et al., 2015).

Por sua vez, os neurônios magnocelulares hipotalâmicos também participam diretamente da regulação neuroendócrina da volemia e osmolalidade respondendo diretamente à estimulação hiperosmótica com um aumento na expressão e secreção de OT e AVP pelos SON e PVN (figura 3; Neumann et al., 1993; Vilhena-Franco et al., 2016; Vilhena-Franco et al., 2019). Além disso, sabe-se que uma subpopulação de neurônios parvocelulares secretores de OT e AVP do PVN também está envolvida na regulação do tônus simpático cardíaco e renal, modulando a excreção de líquidos e frequência cardíaca em consequência à estimulação de receptores sensíveis a volume. De fato, a privação hídrica (24h) resultou em maior imunorreatividade à proteína c-Fos (indicador de atividade neuronal) em neurônios magnocelulares secretores de OT e AVP do PVN de ratos. Conjuntamente, as concentrações plasmáticas de OT e AVP após a privação hídrica apresentaram aumento significativo como consequência da atividade dessa população neuronal na resposta adaptativa a situações de desafio osmótico (Benedetti et al., 2008). Uma sumarização das adaptações do organismo à desidratação é apresentada na figura 4, abaixo:



Figura 4 – Esquematização das principais respostas homeostáticas à desidratação hipertônica e isotônica. É válido mencionar que ambas as respostas podem coexistir de forma simultânea. SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNAS: sistema nervoso autônomo simpático; AVP: vasopressina. As setas pretas fechadas indicam respostas à desidratação hipertônica. As setas vermelhas descontínuas representam as respostas à desidratação isotônica. Adaptado de (Lacey et al., 2019).

Embora tenha um papel muito bem estabelecido como indutora de contrações uterinas durante o parto, promovendo ejeção de leite pelas glândulas mamárias durante a lactação e, ainda, participando da homeostase hidroeletrolítica como um peptídeo natriurético (Gimpl & Fahrenholz, 2001), a OT, mais recentemente, também tem sido estudada no que tange aos seus efeitos centrais de regulação do comportamento, bem como periféricos, modulando o metabolismo energético, demonstrando uma miríade de funções não canônicas (Costa et al., 2021; Wei et al., 2021).

2.3. Papel da ocitocina na regulação do metabolismo energético sistêmico e proteico muscular esquelético

Pesquisas recentes indicam que a OT está intrinsecamente envolvida na modulação da ingestão de alimentos (Blevins et al., 2015; Liu et al., 2021; Morton et al., 2012). Embora ainda seja bastante discutida a capacidade da OT em atravessar

a barreira hematoencefálica, foi demonstrado que sua administração pelas vias intraperitoneal e intranasal produziu efeito anorexigênico similar à aplicação central, com ativação de populações neuronais em núcleos similares; no entanto, apenas com a administração periférica, a OT demonstrou atenuar a hiperglicemia transiente decorrente de um teste intraperitoneal de tolerância a glicose, demonstrando promover a secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas, o que favorece a possibilidade de seu uso clínico no tratamento de distúrbios de hiperfagia e obesidade (Maejima et al., 2015). Tais achados foram subsequentemente corroborados através da demonstração de que o tratamento crônico com OT melhorou a tolerância à glicose e insulina apresentada por camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica, além de promover um aumento na expressão de marcadores de termogênese em tecidos periféricos, dentre os quais o tecido adiposo branco, marrom e ME (Yuan et al., 2020). De fato, Camerino (2020) observou em estudos prévios que a deficiência de OT em camundongos submetidos a estresse térmico prejudicou sua habilidade de termorregulação, uma vez que possuíam menor temperatura de *core* corporal e menor resposta termogênica do tecido adiposo marrom.

Embora a expressão do OTR seja classicamente associada ao músculo liso, já se demonstrou que células mioblásticas também expressam o OTR (Breton et al., 2002) e que a ativação desses receptores em células musculares imortalizadas da linhagem C₂C₁₂ estimulou a captação de glicose (Lee et al., 2008), indicando um papel anti-hiperglicêmico direto desse neuropeptídeo. Além disso, a sinalização ocitocinérgica em músculos oxidativos pode contribuir para a proteção do músculo em situação de estresse térmico, uma vez que um desafio sob refrigeração em camundongos por 5 dias causou um aumento na expressão do gene *Oxtr* no músculo soleus (oxidativo) e, ainda, resultou em transição de fibras musculares do tipo glicolíticas (tipo II) para oxidativas (tipo I) no músculo tibial anterior (Camerino et al., 2019).

Assim, sabendo que o ME, tecido de maior abundância corporal (Frontera & Ochala, 2015), expressa o OTR e, ainda, é capaz de produzir a OT intrinsecamente (Breton et al., 2002; De Jager et al., 2011), poder-se-ia especular que este peptídeo apresentasse capacidade de modulação do metabolismo muscular. Partindo dessa premissa, recentemente nosso grupo demonstrou que o tratamento com OT por 3 dias produziu hipertrofia em músculos esqueléticos oxidativos de ratas. Nesse mesmo estudo, observou-se que a estimulação ocitocinérgica por meio da ativação

farmacológica dos OTR por um agonista não peptídico resultou em diminuição da taxa de degradação proteica, associada à menor atividade dos sistemas proteolíticos autofágico e UPS e expressão dos marcadores do UPS, MuRF-1 e atrogina-1, em um modelo de atrofia muscular induzida pela desnervação motora (Costa et al., 2021).

Interessantemente, já se foi demonstrado que na *diabetes mellitus* tipo I, que é acompanhada por perda de massa muscular e desidratação (Steppel & Horton, 2003), observa-se hipertrofia no soma de neurônios secretores de OT no SON e PVN (Dheen et al., 1994; Luo et al., 2002). Sabendo que a OT regula o metabolismo proteico muscular e energético sistêmico e sua secreção está elevada durante a desidratação, hipotizou-se neste estudo que a sinalização ocitocinérgica possa apresentar um efeito metabólico protetor na condição de estresse osmótico induzida pela privação hídrica.

2.4. Efeitos da desidratação no metabolismo energético

Para além das adaptações neuroendócrinas voltadas à homeostase hidroeletrólítica, deve-se ressaltar que o estresse causado pela desidratação é também capaz de causar alterações no metabolismo energético sistêmico, embora estas não sejam completamente conhecidas.

Camundongos jovens submetidos a um protocolo de privação hídrica com administração de solução salina apresentaram um aumento de quase duas vezes na concentração de glicose no cérebro, além de aumento nas concentrações de alanina, aspartato, glutamato, glutamina e ácido gama-aminobutírico, demonstrando uma possível mudança no transporte de aminoácidos que pode ter sido mediada pela hipernatremia, ou por alterações em outros eletrólitos circulantes, ou ainda um aumento na degradação do conteúdo proteico encefálico. Apesar da maior quantidade de glicose encefálica, a glicemia dos camundongos privados de água foi menor que dos animais controle, o que pode indicar que a maior disponibilidade de glicose para tecidos “prioritários” durante a desidratação, a fim de manter sua função normal (Thurston et al., 1975). Realmente, é possível que o aumento na glicose encefálica seja resultado de maior demanda pela hiperatividade de núcleos específicos, uma vez que o encéfalo, e em particular o sistema hipotalâmico-hipofisário, é responsável por um dos mecanismos de maior importância na adaptação

à desidratação: isto é, a secreção de AVP e OT. De fato, um estudo subsequente destacou a maior expressão dos canais para glicose GLUT1 e GLUT3, cuja atividade é independente da sinalização insulinérgica, no SON e PVN de ratos privados de água (Koehler-Stec et al., 2000).

Por outro lado, quando avaliado o efeito de quatro regimes de privação hídrica sobre a concentração de metabólitos hepáticos, Cui et al. (2015) observaram aumento na concentração de aminoácidos de cadeia ramificada, acompanhado de aumento de glicose, decréscimo na quantidade de glicogênio e glicerol e aumento na proporção de triglicerídeos e ácidos graxos. Tais achados indicam um estado pró-catabólico hepático, no qual as reservas de carboidratos e lipídeos foram degradadas para conversão de energia. Ainda é possível que algumas das alterações catabólicas funcionem como medidas de adaptação contra o estresse osmótico, visto que o gradiente osmótico desses metabólitos pode contribuir para contrabalancear as flutuações relacionadas à osmolalidade.

Um estudo clínico também observou que o déficit de volume plasmático causado pela desidratação induzida por furosemida esteve correlacionado ao desbalanço no metabolismo lipídico, culminando com aumento na circulação de triglicérides e colesterol (Campbell et al., 1998).

Ainda assim, não se pode confirmar ao certo se tais alterações são induzidas apenas como mecanismo de adaptação, ou como consequência negativa ao estresse osmótico, ou ainda ambos. Por isso, o presente trabalho também se propôs a discutir as alterações causadas pela privação hídrica de 36 h no metabolismo energético sistêmico.

2.5. Efeitos da desidratação na função muscular esquelética

O ME é um dos tecidos com maior extensão de nosso corpo, perfazendo quase metade da massa corporal e sua função é dependente de um processo contínuo de proteostase (Baehr et al., 2014; Bodine, 2001). No entanto, diversas condições patológicas, como a acidose metabólica ou jejum prolongado estão associadas a uma perturbação desse mecanismo (Schakman et al., 2013).

Em uma situação de estresse por jejum, mamíferos apresentam um padrão bem conhecido de consumo de substratos, a saber, degradação de carboidratos –

armazenados como glicogênio – seguida por oxidação de lipídeos e, por fim, de proteínas (Schwartz & Seeley, 1997). No entanto, estudos mais recentes têm sugerido que no caso da privação hídrica, não necessariamente associada à privação alimentar, o fenômeno da degradação precoce de proteínas pode ser observado, mesmo antes da depleção lipídica. Uma hipótese para justificar esse fenômeno é, por exemplo, que embora os lipídeos carreguem maior teor energético (cerca de 8x mais que proteínas, e até 10x mais que o glicogênio), são armazenados com quantidade mínima de água, ao passo que proteínas e glicogênio contêm grande proporção dessa molécula (Jenni-Eiermann & Jenni, 2000). Assim, a degradação de proteínas produz, proporcionalmente ao teor energético, maior taxa de água metabólica que a oxidação de lipídeos: para cada 1 kJ/g de proteína degradada, são produzidos 0,155 g de água, ao passo que 0,029 g são produzidos em decorrência da oxidação de 1kJ/g de lipídios (Gerson & Guglielmo, 2011). Deste modo, na necessidade de suporte hídrico, tecidos ricos em proteína poderiam sofrer catabolismo proteico numa tentativa de fornecimento de água (McCue et al., 2017).

O ME é um tecido altamente vascularizado, e sua perfusão deve ser regulada de forma precisa, a fim de atender sua demanda metabólica: quando esta última sofre um aumento significativo, o músculo demanda maior aporte de substratos, que recebe através do fluxo sanguíneo, ao passo que se utiliza do mesmo para remoção de metabólitos (Parise et al., 2020). Assim, a hipovolemia e a consequente menor pressão hidrostática durante o quadro de desidratação podem prejudicar a performance muscular (Cleary et al., 2006). É sugerido que, durante a desidratação, o ME possa experimentar perda de potência, força e resistência decorrente de, pelo menos, quatro mecanismos: (a) cardiovasculares; envolvendo menor débito cardíaco associado a frequência cardíaca aumentada; (b) metabólicos, envolvendo modificação na produção de lactato muscular; (c) de tamponamento e, ainda, (d) de função neuromuscular, embora faltem trabalhos que confirmem detalhadamente cada um dos mecanismos (Judelson et al., 2007).

Um estudo realizado em lutadores de elite demonstrou que indivíduos que se submeteram à perda de massa corporal abrupta, através de restrição alimentar e hídrica, na semana anterior às suas competições apresentaram maior osmolalidade plasmática – acima do valor de referência para o parâmetro –, hipernatremia e aumento de ureia, caracterizando um quadro de desidratação. Essas alterações também estiveram associadas a alteração na concentração de marcadores de injúria

muscular: a atividade de aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) e creatina quinase (CK) em comparação ao grupo controle, indicando um possível quadro de injúria muscular associada à desidratação (Ozkan & Ibrahim, 2016).

González-Alonso et al., (1999) observaram que os músculos dos membros inferiores de indivíduos submetidos à prática de exercício físico sob desidratação recebiam a mesma oferta de glicose e ácidos graxos livres que os hidratados, mas aumentaram a oxidação de carboidratos e produção de lactato. Todavia, uma vez que a exaustão dos indivíduos coincidiu com uma baixa lactatemia e, ainda, pico de temperatura ($\sim 40^{\circ}\text{C}$), é possível que o início de fadiga apresentado pelos participantes desidratados tenha sido mais influenciado pela hipertermia, do que pelas alterações metabólicas *per se*.

No que tange à musculatura esquelética, Farhat et al., (2018) demonstraram que a resposta desse tecido ao estresse osmótico induzido pela privação hídrica de 96 h pode depender da diferente responsividade de cada tipo de fibra muscular à osmolalidade, visto que músculos soleus – de contração lenta e predominância de fibras tipo I – apresentam menor expressão de aquaporina 4 (AQP4), enquanto músculos EDL – do tipo glicolítico, de contração rápida e predominância de fibras tipo II – apresentam maior expressão de AQP4 (em relação ao soleus).

Em um modelo de hipertermia aguda em ratos (6-8h), constatou-se desidratação por meio de aumento no hematócrito, na concentração de proteínas plasmáticas e na osmolalidade plasmática. A perda de água proveniente de órgãos foi observada principalmente no tecido muscular (40%) e pele (30%), enquanto o cérebro e fígado apresentaram menor tendência à perda de fluido, demonstrando que os dois primeiros tecidos apresentam papel importante compensando a perda de água afim de manter a homeostase volêmica (Nose et al., 1983). Curiosamente, foi observado que durante um período de 2:30h de exercício intenso sob alta temperatura o conteúdo de água do músculo vasto lateral – predominantemente recrutado durante a pedalagem – permaneceu inalterado. No entanto, apresentou redução drástica de volume à 1h e às 4h após o fim do exercício, indicando sua possível contribuição na reparação do déficit de volume plasmático decorrente da sudorese e, ainda, que este processo pode ser tempo-dependente (Mora-Rodríguez et al., 2015).

Uma outra avaliação, realizada em indivíduos progressivamente desidratados durante treino de pedalagem, observou uma influência direta da desidratação sobre a

taxa de esforço percebida pelos participantes do estudo, bem como um aumento na oxidação de glicogênio muscular, embora a oxidação sistêmica de carboidratos tenha permanecido inalterada durante os 120 min. de análise. Ademais, tendo em vista que os voluntários apresentaram aumento na concentração de lactato muscular e sérico, é possível que o glicogênio tenha fornecido substrato principalmente para a glicólise (anaeróbica), em detrimento da fosforilação oxidativa. Ainda assim, durante a análise, o *status* energético das células – estimado a partir de quantificação de AMP e ADP livres – permaneceu inalterado (Logan-Sprenger et al., 2013).

De modo geral, as investigações que avaliaram o efeito da desidratação aguda na função e performance muscular fizeram-no em uma situação de estimulação por meio da atividade física, reportando resultados muitas vezes contraditórios, que apontam tanto para o prejuízo, quanto manutenção da função muscular enquanto desidratado. No entanto, a discrepância metodológica entre tais trabalhos pode ser, pelo menos parcialmente, responsável pelos resultados contraditórios. Por exemplo, quando é atribuída exclusivamente à hipohidratação um protocolo que claramente envolveu também restrição calórica e/ou aumento na temperatura muscular e do core corporal (Judelson et al., 2007).

Em uma tentativa de eliminar o componente de estresse térmico resultante do exercício físico, foi observado que a força máxima de contração isométrica muscular (MVIC) permaneceu inalterada por até 16h após uma sessão de treinamento sob desidratação quando comparada à análise feita imediatamente após o término do treino. Quanto à produção de força decorrente de quinze repetições do MVIC, observou-se um decréscimo progressivo independente do *status* de hidratação, indicando que, de fato, a desidratação moderada de forma isolada não prejudicou a performance muscular dos indivíduos testados (J. Périard et al., 2012).

Recentemente, Kitada e colaboradores (2017) descreveram detalhadamente o resultado da ingestão de uma dieta com alto teor salino na homeostase energética e hidrossalina de humanos e camundongos: a ingestão da dieta acompanhada de salina isotônica (substituindo a água de beber) causou um aumento de cerca de 20% na ingesta alimentar, em decorrência de um mecanismo que foi denominado de princípio regulatório natriurético-ureotélico. Este processo compreende um aumento na expressão medular renal de transportadores para ureia, aumentando a sua taxa de reabsorção do fluido urinário, em detrimento de maior excreção de íons sódio. Deste modo, a ureia torna-se o principal contribuinte osmótico para mecanismo de

contracorrente, enquanto o alto teor salino resulta em maior excreção urinária de sódio, o que, por sua vez, aumenta o apetite pelo íon. Esses achados foram acompanhados de aumento na expressão do marcador de autofagia LC3 no ME, bem como maior ativação de receptores para glicocorticoide (GR), indicado pela sua maior expressão em fração ligada à cromatina. Em conjunto, concluiu-se que o estresse osmótico hipersalino induz catabolismo muscular, que é mediado, pelo menos parcialmente, pela sinalização dos glicocorticoides. Todavia, até o presente momento, a caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos na modulação do metabolismo proteico muscular em decorrência do estresse osmótico causado pela privação hídrica ainda não é conhecida. Sendo assim, o presente trabalho constitui-se o primeiro proponente a averiguar o efeito da desidratação nos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do metabolismo proteico muscular em uma situação de repouso.

2.6. Mecanismos moleculares envolvidos na regulação do metabolismo proteico da musculatura esquelética

O ME é o tecido que possui o maior conteúdo de proteínas do organismo (Costa et al., 2021; Frontera & Ochala, 2015) e, para além do movimento voluntário, participa de uma variedade de processos fisiológicos de grande importância, requerendo, portanto, grande demanda energética, a fim de manter sua adequada função (Narvaez-Sanchez et al., 2019).

Nesse sentido, o metabolismo muscular esquelético é regulado de forma precisa por uma série de fatores neurais, humorais e nutricionais (Schiaffino & Mammucari, 2011). Uma vez que o tecido tem característica altamente plástica, pode sofrer ganho ou perda de massa (hipertrofia e atrofia, respectivamente) de acordo com diferentes situações às quais seja submetido, como a prática de exercício físico, ou doenças metabólicas crônicas (Baehr et al., 2014; Jaiswal et al., 2022). Numa situação de desidratação, por exemplo, foi observado decréscimo no volume de um grupo muscular significativamente recrutado durante atividade de pedalagem – o quadríceps femoral –, que foi associado à perda de massa corporal decorrente do déficit de água corporal total. Por outro lado, um grupo muscular que permaneceu menos ativo durante o exercício não demonstrou alteração em seu volume (Hackney et al., 2012).

Dentre os fatores humorais responsáveis pela homeostase metabólica no tecido, grande é a importância daqueles que ativam a cascata de sinalização vinculada à Akt, que possui atividade anabólica, mediando processos de promoção à síntese proteica e anti-catabólica, através inibição da degradação de proteínas. Esta, inclusive, é a proteína efetora da sinalização disparada pela ativação dos receptores de membrana para insulina (Bolster et al., 2004).

Em geral, a ativação da proteína fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) por uma variedade de estímulos dá início a uma série de reações enzimáticas que culminarão com a fosforilação da proteína Akt em resíduos específicos (serina 473 e treonina 308), levando à sua ativação. Uma vez ativada, a Akt é capaz de modular direta ou indiretamente a atividade de uma variedade de alvos, tanto nucleares quanto citoplasmáticos (Manning & Toker, 2017). Um exemplo é o fator TSC2 que constitutivamente inibe a proteína citoplasmática mTORC1, mas deixa de fazê-lo quando fosforilada pela Akt. A consequência à ativação da mTORC1 é a promoção do crescimento muscular, através do estímulo à síntese proteica, por meio da fosforilação e consequente aumento na atividade das proteínas p70S6K e S6 ribossomal, assim como do fator de iniciação translacional eIF4E, após fosforilação e dissociação de sua proteína ligadora, a 4-EBP1 (Qin et al., 2016).

Já o processo de degradação proteica também é regulado pela proteína Akt: esta quinase, quando fosforilada suprime a atividade do fator de transcrição FoxO, cujo efeito biológico é associado à expressão de atrogenes, isto é, genes associados à atrofia muscular (Manning & Toker, 2017).

É sabido que dois sistemas de degradação proteica se destacam na musculatura esquelética, a saber, o dependente de ubiquitina-proteassoma (UPS) e a via autofágica lisossomal (Scicchitano et al., 2018). O primeiro trata-se de um processo altamente seletivo e majoritariamente importante para degradação das proteínas miofibrilares. Tal seletividade é oriunda da marcação específica das proteínas-alvo da degradação por moléculas de ubiquitina, um processo conhecido como ubiquitinização (Baehr et al., 2014).

A performance do UPS como um todo é dependente da atividade de um grupo de enzimas, conhecidas como E1, E2 e E3, que possuem funções particulares (Lecker et al., 2006). A ubiquitina (Ub) é inicialmente ativada pela enzima E1 (ativadora de ubiquitina), sendo, em seguida, transferida para a proteína-alvo por uma enzima catalisadora, E2 (carreadora de ubiquitina), que recebe a ubiquitina e a transfere para

grupos NH_3 nas proteínas ligadas às E3 (ubiquitina-ligase ou Ub-ligase) (Glickman & Ciechanover, 2002). As enzimas Ub-ligases são cruciais para o processo de degradação, pois são responsáveis por identificar e marcar as proteínas que serão degradadas (Lecker et al., 2006). Após a formação do complexo poli-ubiquitinado, normalmente composto por 4 ou mais Ub em resíduos lisina, a estrutura será reconhecida e degradada numa unidade 26S do proteassomal (figura 5) (Baehr et al., 2021).

Dá-se destaque especial a duas Ub-ligases, expressas exclusivamente na musculatura estriada (Bodine, 2001), e que são superexpressas em situações de atrofia, sendo, portanto, conhecidas como atrogenes (Baehr et al., 2021). São elas a MAFbx, também conhecida como Atrogina-1 e a MuRF1 (Baehr et al., 2021), cujas transcrições são reguladas pelo fator FoxO, um alvo direto da proteína Akt (Machado et al., 2016; Zhao et al., 2015).

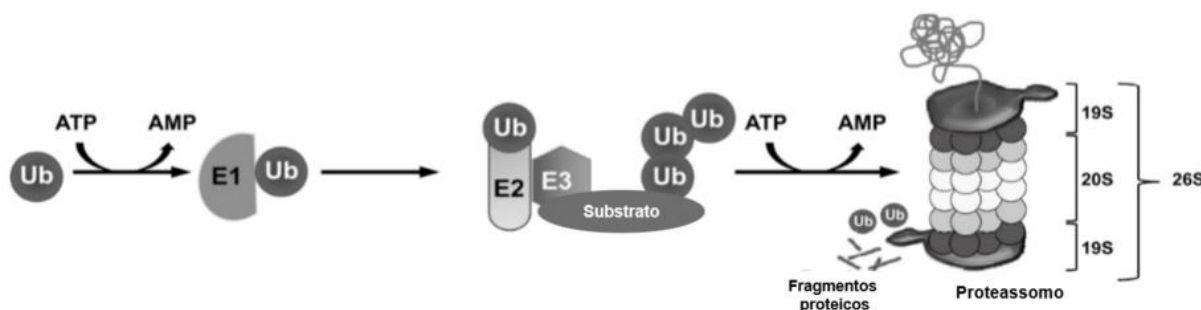


Figura 5 – Representação simplificada da degradação proteica mediada pelo sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma (UPS). A ubiquitina (Ub) é inicialmente ativada pelas proteínas E1, e transferida a uma proteína carreadora de ubiquitina (E2), à qual se liga à proteína ubiquitina-ligase (E3), que carrega consigo o substrato a ser degradado pelo proteassomo. Adaptado de (Scicchitano et al., 2018).

Já o sistema autofágico-lisossomal é responsável pela degradação de proteínas citoplasmáticas e organelas, mesmo de grande tamanho, a exemplo das mitocôndrias disfuncionais (Leduc-Gaudet et al., 2023). Embora três mecanismos de autofagia sejam relatados – a saber, macroautofagia, microautofagia, e autofagia mediada por chaperonas –, acredita-se que o primeiro destes é o principal contribuinte à degradação de proteínas no ME e que, ainda, esse sistema pode demonstrar importância similar ao UPS em várias situações que cursam com a atrofia muscular, tendo em vista que participa da eliminação de componentes disfuncionais e que podem servir como fonte energética numa situação de catabolismo (Eskelinen & Saftig, 2009; Leduc-Gaudet et al., 2023).

Alguns dos mecanismos indutores da autofagia são a infecção viral, resposta do retículo endoplasmático ao excesso de proteínas mal enoveladas, ou ainda situações de estresse por restrição calórica (Eskelinen & Saftig, 2009b). Tais situações induzem dissociação de mTORC1 das proteínas ULK1/2 e Atg13, que são inativadas pela primeira através de fosforilação. A partir daí, o complexo ULK/Atg13, juntamente com outras proteínas, sinaliza para a indução da formação do fagóforo, sendo esta fase denominada de indução). Em seguida, na fase de nucleação, o complexo PI3K-Atg14 (ativado por ULK) produz moléculas de fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP3) a partir de membranas pré-existentes. Este fosfolípido sinaliza para o recrutamento de outras proteínas da família Atg, iniciando a fase de alongamento, em que o fagóforo cresce e se expande para englobar o material que será degradado.

Aqui jaz uma similaridade ao mecanismo do UPS: as proteínas Atg7 e Atg10 (com função similar a E1 e E2), participam da conjugação de Atg5 a Atg12, que em seguida se complexam à Atg16L1, que forma um dímero. O complexo Atg5-Atg12-Atg16, por sua vez, participam da ligação (similar à E3) de uma fosfatidiletanolamina (PE) à proteína LC3, que após lipidada forma a LC3-II, que é incorporada à membrana do autofagossomo. Uma vez formado, o autofagossomo se funde com o lisossomo para formar um autofagolisossomo, mediado por proteínas de fusão como o complexo SNAREs. Dentro do autofagolisossomo, o material englobado será degradado por catepsinas em ambiente ácido e o produto da degradação será então reciclado e reutilizado pela célula (figura 6) (Parzych & Klionsky, 2014).

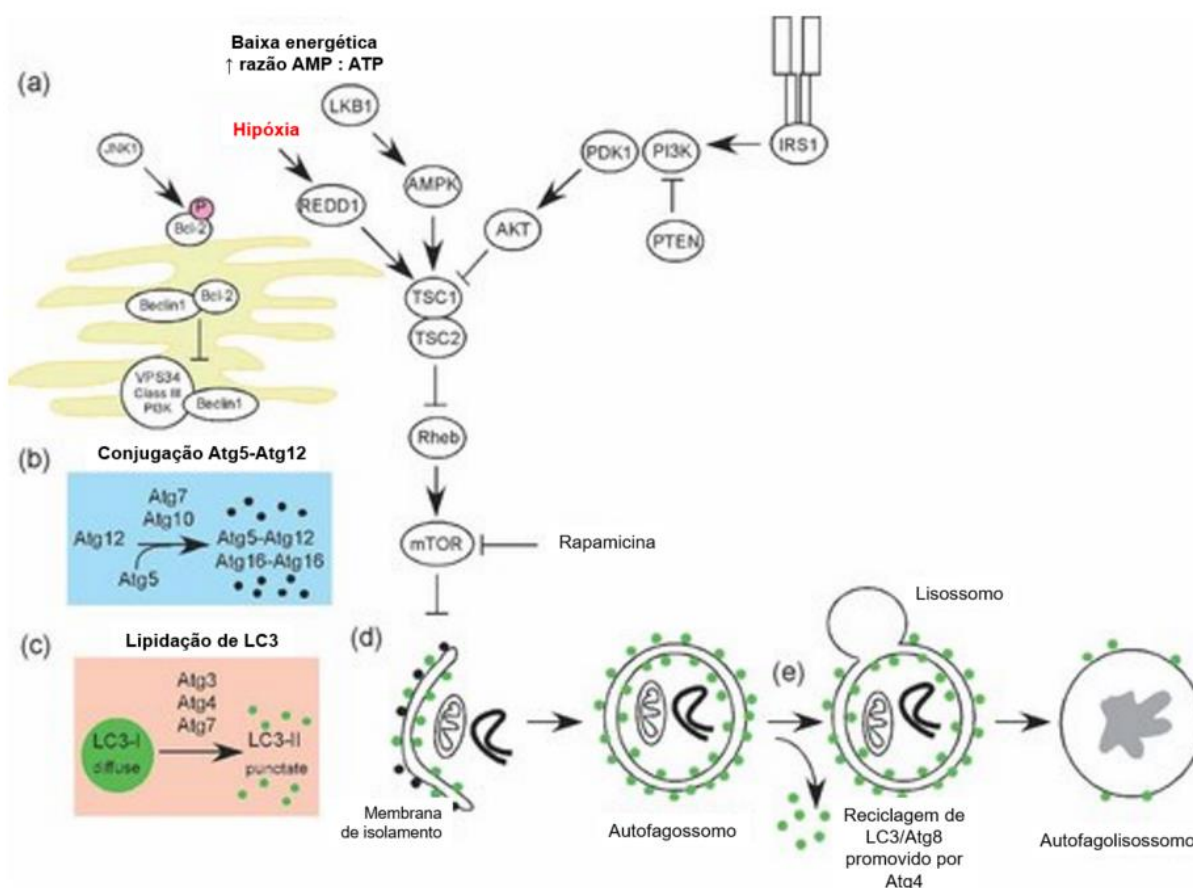


Figura 6 – Representação do mecanismo molecular envolvido no processo de autofagia, desde a formação inicial do fagóforo (a), formação dos complexos proteicos associados ao fagóforo (b, c) e o processo de isolamento das proteínas-alvo e sua consequente degradação (d). Adaptado de (Glick et al., 2010).

Recentemente, demonstrou-se também a mecanística envolvida na ativação do OTR no ME: o receptor é acoplado a uma proteína Gαq, cuja ativação envolve uma sinalização clássica, levando ao aumento da $[Ca^{2+}]$ intracelular, e consequente aumento na atividade da proteína quinase C (PKC), além de uma interação não canônica com a via de sinalização mediada pela proteína quinase B (Akt), culminando com seus efeitos anti-catabólico, por diminuição da proteólise total, autofágica e UPS (Costa et al., 2021; Santos et al., 2023). Todavia, o efeito da sinalização OTérgica na musculatura esquelética durante a privação hídrica ainda não é conhecido e, embora tenha-se descrito recentemente o potencial pró-catabólico da dieta hipersalina, outro estresse hiperosmótico, sobre o metabolismo muscular, induzindo proteólise autofágica e ainda redistribuição de aminoácidos para o fígado, a fim de fornecer substrato para o ciclo da ureia (Kitada et al., 2017), o efeito da privação hídrica na função muscular esquelética ainda é pouco esclarecido em literatura.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da privação hídrica (36 h) sobre o metabolismo energético sistêmico e proteico muscular esquelético e da sinalização ocitocinérgica na manutenção da massa muscular no mesmo modelo.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da privação hídrica de 36h no metabolismo energético sistêmico;
- Avaliar o efeito da privação hídrica de 36h e a possível contribuição da sinalização ocitocinérgica na manutenção da massa muscular;
- Elucidar a(s) via(s) de regulação do metabolismo proteico muscular moduladas pela privação hídrica de 36 h;

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, com 8 a 12 semanas de vida e massa corporal aproximada de 25 a 30 gramas. Até o desmame, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório Multiusuário de Neurociência Molecular de Sergipe (LaNMSE). Após o desmame, foram transportados para o biotério do Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório (LAFAPI), até o momento da experimentação. Receberam dieta padrão balanceada para roedores (NUVILAB® CR1, Nuvital, Colombo, Brasil; 5% gordura, 22% proteína, 44,5% carboidratos – 2,75 kcal/g) e água *ad libitum* (exceto quando em experimentação), em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 / 12h (claro: 6:00h-17:59h; escuro: 18h-5:59h) e temperatura aproximada de 23°C (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, 2023). Todos os experimentos foram iniciados à noite no caso da privação hídrica (~21h) e finalizados pela manhã (~ 9h).

A eutanásia foi realizada majoritariamente por meio de deslocamento cervical por profissional habilitado, sem uso prévio de anestesia. O método encontra-se de acordo com as recomendações do guia brasileiro de boas práticas para a eutanásia animal (Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2013). Quando necessário, os animais foram eutanasiados por decapitação, para coleta de sangue, também sem uso prévio de anestesia.

O presente projeto foi submetido ao conselho de ética da instituição (CEPA/UFS) e aprovado em 18.02.2023 sob registro nº 4492070222.

4.1.1. Delineamento experimental

O modelo de privação hídrica empregado consistiu em 36 h de privação total de fluidos (Dumas et al., 2020), com expectativa de induzir desidratação hipertônica. No dia de indução do modelo (fotoperíodo claro) os animais foram separados em caixas individuais, onde permaneceram até o fim do experimento. Às 21h deste mesmo dia, isto é, três horas após o início do ciclo escuro, os animais foram pesados e divididos em seus respectivos grupos: (a) controle, que permaneceu com água e

ração à vontade durante as 36 h e (b) privação hídrica (WD), que sofreu restrição total de fluidos por 36 h, mas permaneceu com ração à vontade.

Após avaliação em um experimento piloto (vide resultados), observamos que a ingestão alimentar do grupo WD reduziu significativamente, totalizando um equivalente percentual de aproximadamente 75% em comparação aos animais controle. Por isso, foi necessária a inserção de um terceiro grupo experimental no delineamento, com alimentação pareada:

- a) Alimentação pareada (*Pair-feed*), permaneceu com água à vontade, mas teve o fornecimento de ração restrito a aproximadamente 75% comparado ao controle, mimetizando a hiporexia observada nos animais WD.

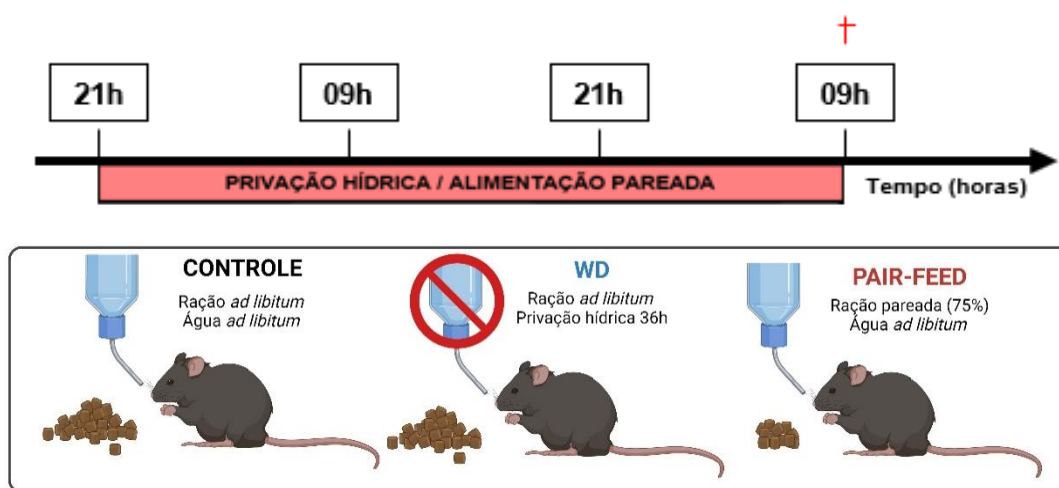


Figura 7 – Esquematização do delineamento experimental. Às 21h os animais foram pesados e, para os grupos específicos, tiveram a alimentação restrita ou privação hídrica. A eutanásia foi realizada às 9h (indicado pela cruz vermelha), totalizando 36 horas de privação.

Relatos prévios indicam que roedores em geral apresentam excelente adaptação, de modo que conseguem suportar até 24 horas de privação hídrica sem apresentar sinais externos de estresse fisiológico, ou anormalidades comportamentais (Dumas et al., 2020). Embora alguns parâmetros fisiológicos indicativos de desidratação pareçam não se alterar significativamente após 12-24 horas de privação total de fluidos (Bekkevold et al., 2013), somente após 36 horas sem água que células endoteliais da medula renal apresentam adaptação na expressão gênica em decorrência estresse osmótico, indicando que neste período do tempo outras adaptações, inclusive de cunho metabólico possam se seguir (Dumas et al., 2020). Portanto, utilizamos neste trabalho o modelo de 36 h de privação hídrica, sendo importante ressaltar que os animais não apresentaram sinais evidentes que

indicassem sofrimento ou angústia. No início e fim dos experimentos, os animais foram pesados, bem como ingestão alimentar e hídrica.

4.2. Ensaio *ex vivo* de estimativa de degradação proteica

A estimativa quantitativa de degradação proteica deu-se por meio de análise fluorimétrica da concentração de tirosina liberada pelo músculo em meio de incubação apropriado (Kettelhut, 1988).

Imediatamente após a eutanásia, os músculos soleus foram coletados e presos em suportes plásticos apropriados, em comprimento de repouso, sob perfusão em meio de incubação adequado, que consistiu no tampão Krebs-Ringer bicarbonato (120 $\mu\text{mol/L}$ de NaCl; 15 $\mu\text{mol/L}$ de NaHCO_3 ; 4,828 mmol/L de KCl; 1,2 mmol/L de MgSO_4 ; 1,212 mmol/L de KH_2PO_4 ; 2,4 mmol/L de CaCl_2 , - pH 7,4; 37°C) aerado com mistura de carbogênio (O_2 95% + CO_2 5%) e acrescido de glicose 5 mmol/L e um inibidor de síntese proteica, ciclohexamida (0,5 mmol/L). Esse preparo visa homogeneizar a perfusão de nutrientes, seja no centro ou periferia do tecido, garantindo manutenção da concentração intracelular de ATP, glicogênio e fosfocreatina, o que reproduz o *status* energético do músculo enquanto in vivo (Kettelhut, 1988).

Os músculos foram pré-incubados em 2mL de solução por 1 hora (para acondicionamento inicial do tecido) e, em seguida, o meio foi substituído por volume igual e os músculos incubados por outras 2h. Ao final deste período, um volume de 1 mL do tampão foi coletado e homogeneizado com 250 μl de ácido tricloroacético (TCA) 10% e uma mistura de nitroso naftol + ácido nítrico 70% (1:1). A solução foi mantida em banho-maria a 55°C por 30 min. para catálise da reação e em seguida, a solução foi novamente homogeneizada, em temperatura ambiente, após adição de 6 mL de clorofórmio. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 24°C, por 12 min., a 3000 g e o sobrenadante coletado para leitura em espectrofluorímetro (FP-8600, Jasco) com excitação sob onda de 450 nm comprimento e leitura de emissão a 570 nm. A leitura foi realizada no centro de laboratórios de química multiusuários, nesta universidade (CLQM-UFS).

4.3. Ensaio *in vivo* de estimativa de síntese proteica

O método SunSET para estimação de síntese proteica foi utilizado para avaliação da síntese proteica muscular (Goodman & Hornberger, 2013). Aos 30 min. anteriores às 36 h de privação hídrica, os animais receberam uma aplicação intraperitoneal de puromicina na concentração de 0,04 $\mu\text{mol/g}$ em NaCl 0,9%. Posteriormente, o conteúdo de puromicina foi examinada através do método Western Blotting, por meio de marcação com anticorpo específico anti-puromicina. Para controle negativo (C-), foi utilizado um animal que não recebeu injeção prévia de puromicina. Para controle positivo (C+), o animal recebeu uma aplicação intraperitoneal de insulina (0,75 U/kg) 10 min. antes da puromicina (Vinué & González-Navarro, 2015).

4.4. Western blotting

A avaliação semiquantitativa de expressão proteica foi realizada pela técnica de western blotting. Os músculos foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em -80°C até o seu processamento. Para a extração proteica, o tecido foi homogeneizado por 2 min. em tampão de lise com pH 7,4 (50 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 1 mmol/L de EDTA, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio, 1% de dodecil sulfato de sódio), acrescido de coquetel inibidor de proteases, 1 mmol/L de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e de os inibidores de fosfatases 10 mmol/L de ortovanadato de sódio, 10 mmol/L de pirofosfato de sódio e 100 mmol/L de fluoreto de sódio e, então, centrifugados para obtenção do sobrenadante (14.000 g, 4°C , 20 min.). A quantificação de proteínas foi realizada conforme previamente descrito (Lowry et al., 1951).

O sobrenadante coletado foi acrescido, numa proporção de 1:1, com o tampão de amostra Laemmli 2X (20% de glicerol, 125mM de Tris, 4% de SDS, 100mM de ditioneitol, 0,02% de azul de bromofenol, pH 6,8) e 30-50 μg de proteína foram utilizadas para a eletroforese em gel SDS-PAGE após aquecidas por 5 min. à temperatura de 70°C . Em seguida, as proteínas no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema semisseco, sob corrente de 400 mA, por 30min.

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 1 hora em solução de 5% de leite desnatado em pó diluído em TBS-T (20 mmol/L de Tris, 160 mmol/L de NaCl e 0,1% de Tween 20). Em seguida, foram lavadas em TBS-T por 3x de 5 min. cada e incubadas sob refrigeração (4°C) com os anticorpos primários específicos (tabela 2). No dia seguinte, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T (3x de 5 min. cada) e incubadas com os anticorpos secundários apropriados, conjugados a uma peroxidase, por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, as imagens foram reveladas em fotodocumentador iBright® CL1000 (Thermofisher) ou Chemidoc® (Bio-rad) após rápida lavagem em reagente amplificador de quimioluminescência (ECL).

A quantificação densitométrica das bandas foi realizada através do software ImageLab BioRad® ou iBright® Analysis Software. Após serem quantificados, os valores foram corrigidos pela densitometria da β -actina, proteína utilizada como controle de carregamento.

Tabela 2 – Lista de anticorpos utilizados para as marcações de western blotting

Anticorpo anti-	Código	Marca	Diluição
Puromicina	EQ001	Kerafast	1:1000
p-Akt ^{Ser473}	#4060	Cell Signaling	1:500
Akt	#9272	Cell Signaling	1:500
p-FoxO1 ^{Ser256}	sc-101681	Santa Cruz Biotechnology	1:500
FoxO1	sc-11350	Santa Cruz Biotechnology	1:500
p-FoxO3A ^{Ser253}	sc-12897	Santa Cruz Biotechnology	1:500
β -actina	sc-8432	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
MuRF-1	PA5-76695	Invitrogen	1:500
Poli-ubiquitina	14-6077-82	Invitrogen	1:1000
LC3	PA146286	Invitrogen	1:1000
SQSTM1/p62	MA5-32835	Invitrogen	1:1000
Receptor para OT (N-19)	Sc-8103	Santa Cruz Biotechnology	1:500
p-substratos ^{Ser} PKC	#2261	Cell Signaling	1:1000

Aquaporina 4 (D1F8E) XP®	59678 S	Cell Signaling	1:500
Mouse anti-Goat IgG, HRP	Sc-2354	Santa Cruz Biotechnology	1:2000
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), HRP	31460	Invitrogen	1:2000
Goat anti-Mouse IgG (H+L), HRP	31430	Invitrogen	1:2000

4.5. Imunofluorescência

4.5.1. Marcação de WGA em músculos

Um grupo de camundongos foi submetido a anestesia com isoflurano e perfundidos por via transcardíaca com solução de PBS 0,1 M + heparina 1% seguida de solução fixadora de paraformaldeído (PFA) a 4% em PBS 0,1 M. Em seguida, os músculos de interesse foram coletados de uma das patas pós-fixados em solução de PFA 4% por 24 horas, seguida de solução de sacarose a 30% por 48 horas, sob refrigeração, para desidratação dos tecidos.

Os músculos foram cortados em criostato numa espessura de 12µm diretamente em lâminas de microscopia. Em seguida, as lâminas com os cortes foram

(i) lavadas com solução de Triton X-100 0,1% em PBS 0,01M para permeabilização do tecido;

(ii) lavadas com PBS 0,01M por 3x de 5 min.;

(iii) incubadas com solução de WGA (wheat germ agglutinin) 1:1000 conjugada com o fluoróforo Alexa Fluor® 488 para marcação da membrana das fibras musculares (tabela 2) e

(iv) lavadas com PBS 0,01M por 3x de 5 min.

Por fim as lâminas de microscopia foram montadas após adição de solução de montagem com preservação de fluorescência Fluoromount®, lamínula e, quando secas, aplicação de esmalte para fixação do conjunto lâmina-lamínula. As fibras musculares foram capturadas em aumento de 40X e a área de secção transversa foi calculada de forma semi-automática por meio do plug-in “*Cross sectional analyzer*” no software FIJI ImageJ.

4.5.2. Marcação de atividade neuronal

Os mesmos animais perfundidos no protocolo acima tiveram seus cérebros coletados e cortados em criostato em secções flutuantes de 30 μ m, que foram armazenadas a -20°C em solução de criopreservação (glicerol 20% + etilenoglicol 30% em PBS 0,01M) até o seu uso. No momento da confecção, os cortes foram transferidos para placas de 24 poços e

(i) lavados com PBS 0,01M por 3x de 5 min., para limpeza da solução de criopreservação;

(ii) bloqueados em solução de PBS 0,1M acrescido de 5% de soro de burro e 0,3% de Triton X-100 por 1h, a temperatura ambiente;

(iii) incubados em anticorpos primários (tabela 2) diluídos em solução de PBS 0,1M acrescido de 2% de soro de burro e 0,3% de Triton X-100 sob refrigeração overnight;

(iv) lavados com PBS 0,01M por 3x de 5 min. cada;

(v) incubados em anticorpos secundários conjugado a fluoróforo diluídos em solução de PBS 0,1M acrescido de 2% de soro de burro e 0,3% de Triton X-100 por 1 hora a temperatura ambiente;

(vi) lavados com PBS 0,01M por 3x de 5 min. cada e

(vii) incubados com solução de DAPI (1 mg/mL) 1:5000 por 10 min. à temperatura ambiente.

Por fim as lâminas de microscopia foram montadas após adição de solução de montagem com preservação de fluorescência Fluoromount®, lamínula e, quando secas, aplicação de esmalte para fixação do conjunto lâmina-lamínula. A contagem de neurônios imunorreativos para c-Fos, Neurofisina II (AVP) e ocitocina nos cortes encefálicos foi feita manualmente no software FIJI ImageJ. A marcação do DAPI foi utilizada durante as análises para confirmação de co-localização de c-Fos no núcleo celular. As capturas do núcleo PVN foram feitas em aumento de 10X, enquanto o SON foi capturado em 40X. As escalas e magnificações estão descritas apropriadamente em cada legenda.

A leitura de fluorescência foi realizada em microscópio de fluorescência confocal Leica TCS SP8.

Tabela 3 – Lista de anticorpos utilizados para as marcações de imunofluorescência

Anticorpo	Código	Marca	Diluição
Aglutinina de germe de trigo (WGA), conjugada a Alexa Flúor 488	W11261	Invitrogen	1:1000
Ocitocina	T-4084	Peninsula Laboratories	1:2500
Neurofisina II (PS 41)	MABN845	Sigma	1:500
c-Fos	226 004	Synaptic Systems	1:2000
DAPI	d9542	Sigma	1:5000
Donkey Anti-guinea pig (H+L) conjugado a Alexa Flúor 488	706-545-148	Jackson Immunoresearch	1:300
Donkey Anti-rabbit (H+L) conjugado a Alexa Flúor 680	711-625-152	Jackson Immunoresearch	1:300
Donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugado a Alexa Flúor 594	R37115	Invitrogen	1:300

4.6. Calorímetro

Para avaliação por calorimetria indireta, os animais foram mantidos em aparelho de monitoramento animal (Oxymax-CLAMS®, Comprehensive Lab Animal Monitoring System; Columbus Instruments, OH, EUA), lotado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo.

Os animais foram individualizados em caixas apropriadas, com ração e água oferecidas *ad libitum*, e passaram por um período de aclimação de pelo menos 48h. Em seguida, os dados basais foram registrados durante as 36 h prévias à indução do modelo de privação hídrica (WD) ou restrição alimentar pareada (*pair-feed*). Após o período de mensuração basal, os animais foram submetidos ao modelo experimental e analisados por outras 36 h, sendo contabilizado, durante a restrição, dois períodos noturnos (21:00 às 5:59h e 18:00 às 5:59h) e dois diurnos (6:00 às 17:59h e 6:00 às

9:00h). Ao fim das análises, os animais foram submetidos à eutanásia. Os dados de cada gaiola foram mensurados a cada 20 min. e o valor médio correspondente a cada 3h foi utilizado para as análises.

Foram mensurados o volume de consumo de oxigênio (VO_2 ; mL/min) e produção de gás carbônico (VCO_2 ; mL/h) e esses dados, segundo o fabricante, são utilizados para o cálculo de quociente respiratório e produção de calor (kcal/h) conforme descrito abaixo:

Quociente respiratório (QR): ($VCO_2 : vO_2$) (unidade arbitrária)

Calor: $Calor = CV * VO_2$

Valor calorífico (CV): $CV = 3,815 + (1,232 * QR)$

4.7. Quantificações bioquímicas

A quantificação de sódio foi realizada em fotômetro de chama Micronal B-462. O colesterol sérico foi mensurado por teste colorimétrico (Labtest), segundo as instruções do fabricante e a glicose foi aferida por fitas de glicosímetro (Accu-chek® Active, Roche), imediatamente antes da eutanásia. Em decorrência do modelo estudado, os animais não foram mantidos em jejum prévio antes da coleta de amostras para avaliação sanguínea.

4.8. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, a significância estatística foi avaliada por teste apropriado para cada situação, conforme descrito em cada uma das legendas. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$). Os gráficos representativos foram confeccionados no *software* GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad, MA, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do modelo de desidratação induzido por privação hídrica de 36 h

A desidratação refere-se à deficiência no conteúdo de água corporal, e é frequentemente associada à ingestão inadequada de fluidos, seja de forma aguda ou crônica, embora condições clínicas (e.g. vômito e diarreia) também possam contribuir para esse fenômeno (Frith, 2023). É associada a uma série de prejuízos funcionais, como o aumento significativo na taxa de mortalidade de indivíduos idosos sem doenças subjacentes, mas com hipertonidade (Brennan et al., 2019) e o desenvolvimento de doenças crônicas e sarcopenia (Yoo et al., 2018). De fato, demonstrou-se que homens e mulheres sarcopênicos apresentavam ingestão hídrica significativamente menor que indivíduos da mesma idade não sarcopênicos (Yoo et al., 2018). Além disso, foi observado que indivíduos submetidos a trabalho físico extenuante em situações de hipertermia associada à desidratação possuíam aumento significativo de marcadores de lesão renal (Chapman et al., 2020). É possível que esse achado esteja diretamente associado à mioglobinúria, uma condição em que o vazamento de mioglobina das células musculares danificadas (e.g. rabdomiólise) para a corrente sanguínea resulta em sua filtração excessiva pelos néfrons, o que pode resultar em redução na taxa de filtração glomerular e, conseqüentemente, insuficiência renal aguda (Ememe & Edeh, 2022). Deste modo, a desidratação constitui-se um potencial agravante à saúde de indivíduos de qualquer idade (Kim et al., 2020).

Nesse contexto, objetivamos no presente trabalho elucidar as alterações no metabolismo energético sistêmico e do metabolismo proteico muscular esquelético decorrentes da desidratação em camundongos C57BL/6 machos. Para tanto, inicialmente buscamos caracterizar o modelo de privação hídrica de 36 h. Embora o organismo procure adaptar-se à situação de restrição por meio de aumento na concentração urinária (Kovarík et al., 2021), a água é ainda consumida por outras rotas, que incluem, além de processos metabólicos, as perdas insensíveis, que podem ocorrer através da transpiração passiva, por exemplo (Popkin et al., 2010). Deste modo, esperávamos que ao final da privação hídrica (WD) os animais apresentassem menor massa corporal (Isik et al., 2018), o que foi, de fato, observado (figura 8a;

$p < 0,01$). Após o período de 36 h, os animais desidratados perderam cerca de 4 gramas, o que corresponde ao percentual aproximado de 16% quando consideramos a média do grupo, de aproximadamente 25 gramas de massa corporal. De modo similar, Bekkevold et al., (2013) observaram perda de 15% na massa corporal de camundongos submetidos à 24h de privação de fluidos.

Em decorrência do estresse hiperosmótico causado pela privação hídrica, e considerando que a alimentação é rica em partículas osmoativas esperávamos ainda, que o modelo pudesse ocasionar alteração na ingestão alimentar (Chang et al., 2020). Por isso, avaliamos o consumo médio de ração pelos animais durante as 36 h do modelo. Ao final, observamos que os camundongos desidratados de fato apresentaram hiporexia, isto é, menor consumo alimentar, em relação ao grupo controle, consumindo um quantitativo equivalente a 77% do grupo controle (figura 8b; $p = 0,01$).

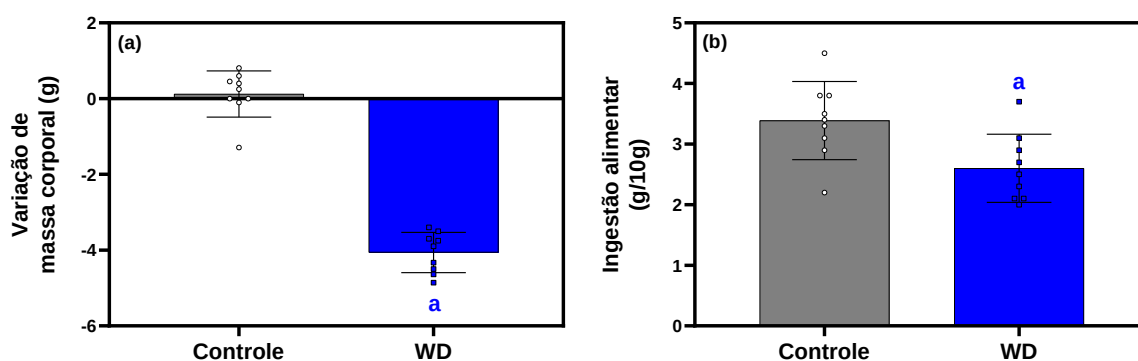


Figura 8 - Variação de massa corporal (a) e ingestão alimentar (b) em camundongos C57BL/6 machos submetidos a 36 horas de privação hídrica total (WD). Os valores estão representados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos ao teste t de student. ^a = $p < 0,05$ vs. controle.

Há muito observou-se a direta associação entre o consumo alimentar e hídrico: a maior parte (chegando aos 70%) da ingestão de água durante o dia é observada em períodos imediatamente anteriores, posteriores, ou durante as maiores refeições (Engell, 1988; Popkin et al., 2010). Isso é justificado pelo fato de os alimentos serem um misto de compostos osmoticamente ativos, como glicose, sódio e outros eletrólitos, de modo que a ingestão de água é necessária para restaurar a homeostase de fluidos e evitar a hiperosmolalidade plasmática. Outros mecanismos incluem a anti-diurese (retenção de líquidos), sensação de sede e natriurese. Assim, no caso da

desidratação, que constitui um estresse hiperosmótico, a hiporexia se seguirá (Zimmerman et al., 2017). Além disso, é notável que existe integração entre vias ascendentes que monitoram tanto alterações de fluido extracelular e osmolalidade quanto o controle da ingestão alimentar, como é o caso do NTS. Desse modo, alterações agudas na homeostase hidroeletrolítica e energética podem induzir alterações adaptativas de forma recíproca (Ruginsk et al., 2015).

Considerando que a restrição alimentar é acompanhada de alterações metabólicas que, por sua vez, poderiam influenciar nos parâmetros que seriam analisados em seguida (Secor, 2016), incluiu-se no delineamento experimental um terceiro grupo, com alimentação pareada (*pair-feed*), que recebeu apenas 75% de ração em comparação ao consumo médio do grupo controle, tornando sua ingestão equivalente à dos animais privados de água.

Ao comparar os parâmetros fisiológicos entre os três grupos num momento basal (0h), que compreendeu as 36 h anteriores à privação hídrica e restrição alimentar e durante o modelo (36 h), que compreendeu o período posterior à privação hídrica e restrição alimentar até o fim do experimento, notamos que, durante o período basal, não houve diferença no tangente à variação de massa corporal, ingestão alimentar e hídrica, conforme esperado. Já durante o período experimental (36 h), houve perda significativa de massa corporal no grupo WD (~15,5% vs. controle; figura 9a; $p < 0,01$), novamente acompanhada de hiporexia (-25,5% vs. controle; figura 9b; $p < 0,05$), mas não no grupo *pair-feed* ($p = 0,8176$; figura 9a). Esse achado indica que a restrição alimentar associada à perda de água não é o único fator responsável pela menor massa corpórea dos animais. Uma vez que o corpo é formado majoritariamente por água, o próprio déficit hídrico decorrente da privação, associado às perdas (e.g. urina, termorregulação), é capaz de resultar na perda de massa (Jéquier & Constant, 2010). Além disso, a desidratação é causa de estresse metabólico e, por isso, capaz de – *per se* – induzir o catabolismo energético, inclusive com utilização predominante de lactato e β -hidroxi-butilato (corpo cetônico) como fonte de energia, em detrimento da acetil-coenzima A no ciclo de Krebs (Cui et al., 2015).

O grupo *pair-feed* sofreu diminuição significativa de ingestão alimentar em relação ao controle, mas não ao WD ($p = 0,4016$; figura 9b), validando o percentual de 75% de alimentação pareada. Além disso, observamos que embora a privação hídrica tenha resultado em hiporexia, o contrário não foi verdadeiro, isto é, a

alimentação pareada não resultou em menor ingestão hídrica ($p = 0,5362$ vs. controle; figura 9c).

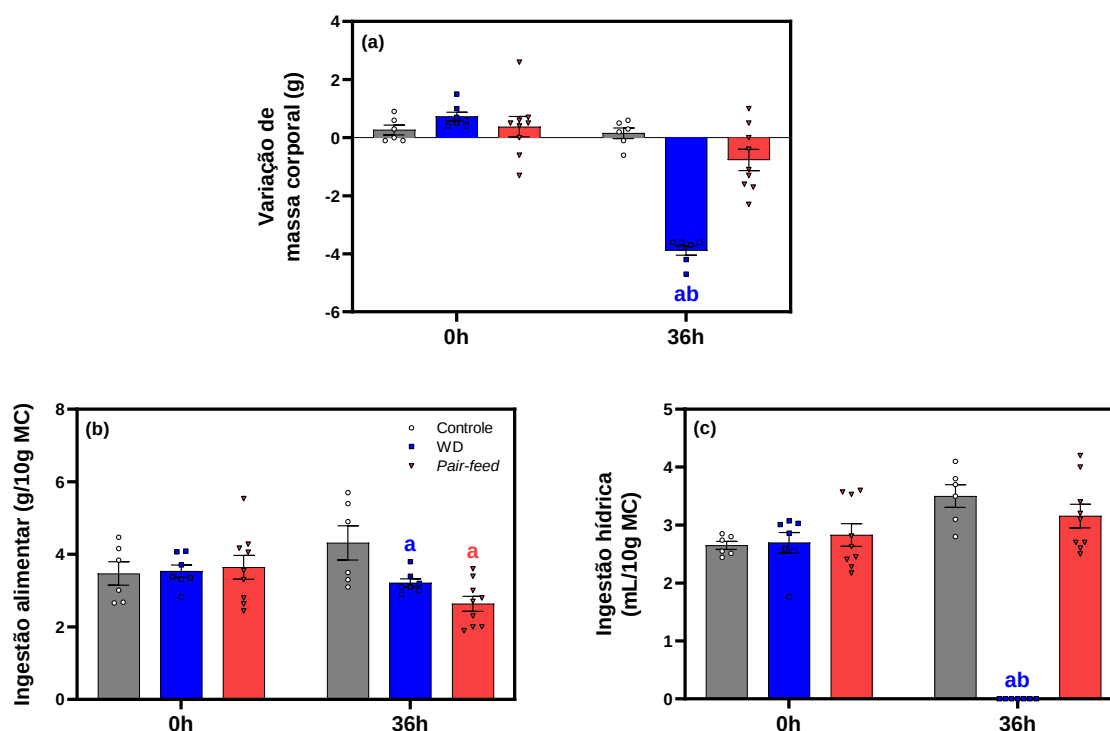


Figura 9 – Variação de massa corporal (a), ingestão alimentar (b) e ingestão hídrica (c) de camundongos C57BL/6 machos submetidos à privação hídrica (36 h). Os valores representam um período basal de 36 h prévias ao modelo (ponto 0h) e o período de privação hídrica e restrição alimentar (ponto 36 h). Os valores estão representados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados não paramétricos foram submetidos a teste de Kruskal-Wallis (figura 2a – ponto 36 h) seguido de pós-teste de Dunn, enquanto os dados paramétricos ao teste one-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. ^a = $p < 0,05$ vs. controle e ^b = $p < 0,05$ vs. alimentação pareada (*pair-feed*). MC = massa corporal.

Posteriormente, confirmou-se o estado de desidratação dos animais por meio de marcadores específicos: a quantificação de sódio plasmático e avaliação de hematócrito (Bennet et al., 2021). Curiosamente, os animais desidratados não apresentaram aumento no hematócrito em comparação aos animais-controle (tabela 4; $p > 0,99$), no entanto, desenvolveram hipernatremia, caracterizando uma situação de desafio osmótico (tabela 4).

Tabela 4 – Caracterização do efeito da privação hídrica de 36h no hematócrito e na concentração plasmática de sódio em camundongos C57BL/6 machos

	Controle	WD	<i>Pair-feed</i>
Hematócrito (%)	54,8 ± 3,39	54 ± 5,11	49,75 ± 1,03
Na⁺ (mEq/L)	152,86 ± 0,50	161,9 ± 0,64 ^a	153,75 ± 1,09

Valores de hematócrito e de sódio plasmático de camundongos C57BL/6 machos submetidos à privação hídrica de 36 h (n = 4-6/grupo). Os valores estão representados como média ± EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos ao teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni. ^a = p<0,05 vs. controle.

Quando desidratados, mamíferos apresentam menor volume plasmático, enquanto a quantidade de eritrócitos circulantes permanece constante. Somado ao possível estresse causado pela privação, que pode levar à contração esplênica, esperar-se-ia que a hemoconcentração, com consequente aumento do hematócrito fosse observada (Okediran et al., 2021). A ausência deste achado nos pode indicar que até o momento da análise, os camundongos conseguiram com sucesso utilizar-se de mecanismos de adaptação à restrição hídrica com retenção de líquidos, de modo que, mesmo em um estado de hipernatremia, a hemoconcentração não aumentasse significativamente o hematócrito. Previamente, achados similares foram observados em ratos desidratados por 24h (Felintro et al., 2023). Ainda assim, a hipernatremia observada – não associada a aumento na ingestão de sódio – confirma o estado de desidratação (Watso et al., 2019).

É bem conhecido na literatura o efeito da desidratação aguda induzindo maior atividade de neurônios magnocelulares secretores de AVP e OT no SON e PVN do hipotálamo (Leng & Russell, 2019; Telleria-Diaz et al., 2001; Wakerley et al., 1978) e, embora não seja apreciada como função canônica, é relatado que ambos os neuropeptídeos podem participar da modulação do metabolismo energético em certas condições (Florian et al., 2010; Yoshimura et al., 2021; Yuan et al., 2020). Portanto, investigamos se o modelo estudado nesse estudo, de privação hídrica de 36 h, seria capaz de induzir aumento na atividade de neurônios secretores de OT e AVP no SON e PVN hipotalâmicos.

Para tanto, avaliamos por meio de imunofluorescência a maior expressão nuclear da proteína c-Fos, um marcador de atividade neuronal, nos núcleos PVN e

SON do hipotálamo dos camundongos WD (figuras 10 e 11, respectivamente). O c-Fos é uma proteína que, ao formar um dímero com c-Jun, atua como um fator de transcrição (AP-1), modulando a transcrição de vários genes. Por isso, tem sido muito utilizado como marcador de atividade celular em diversos âmbitos da neurociência (Lara Aparicio et al., 2022). Após quantificação, observamos que em decorrência da WD, mas não da alimentação pareada, houve um aumento significativo no percentual de neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos imunorreativos para a proteína c-Fos, tanto no PVN (AVP^{c-Fos+} 80,6% WD vs. 2,94% controle – $p < 0,01$; OT^{c-Fos+} 14,42% WD vs. 0,05% controle – $p < 0,05$; figura 10), quanto no SON (AVP^{c-Fos+} 96,5% WD vs. 1,07% controle – $p < 0,01$; OT^{c-Fos+} 47,27 WD vs. 2,38% controle – $p < 0,01$; figura 11). Proporcionalmente, a população de neurônios AVPérgicos ativados em ambos os núcleos foi maior que a neurônios OTérgicos ativados, indicando uma maior contribuição do AVP para o quadro de privação hídrica, o que já era esperado, uma vez que se observa maior concentração plasmática de AVP que de OT após um estímulo de privação hídrica, tanto em machos quanto fêmeas (Quirós Cognuck et al., 2020).

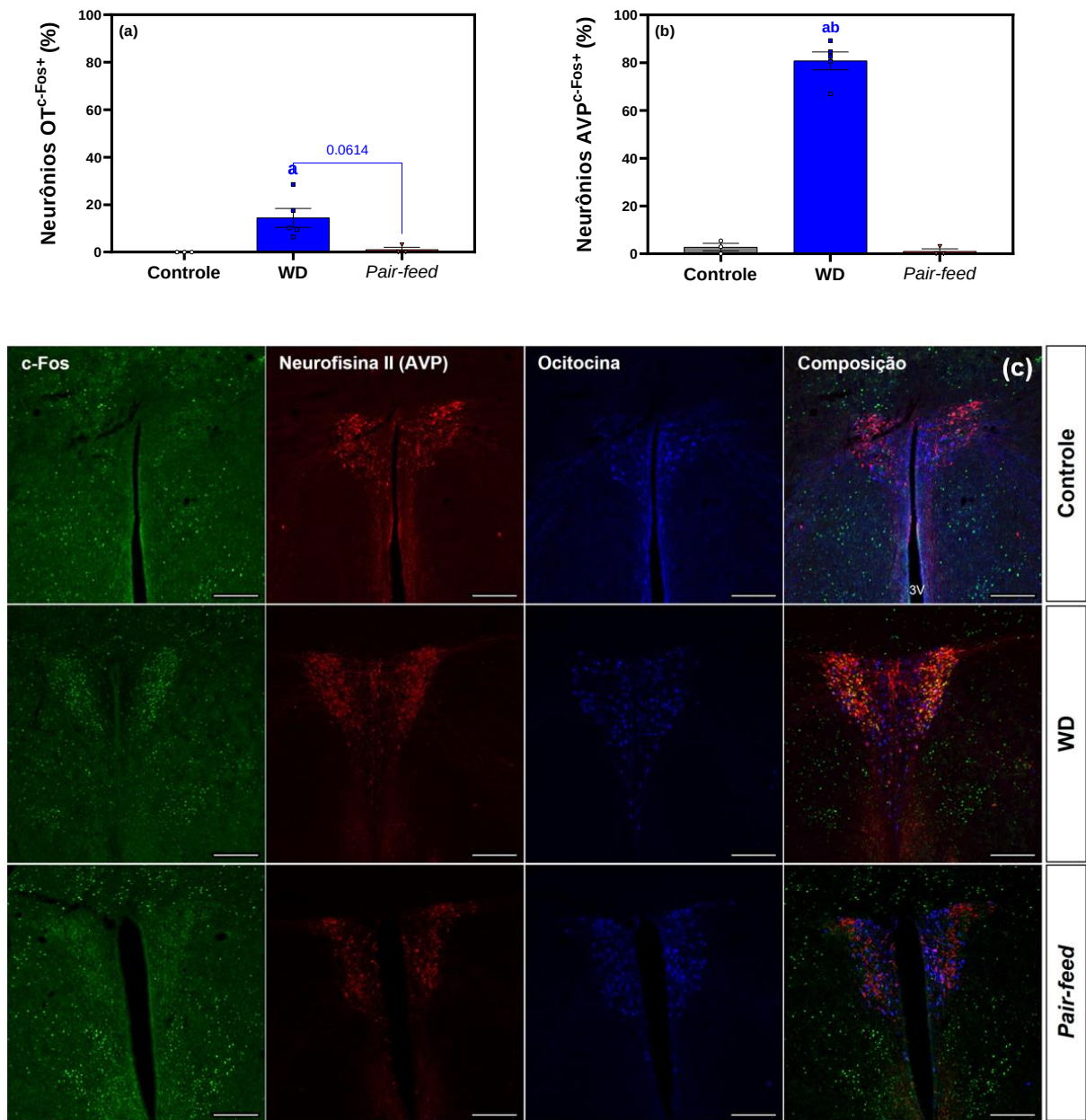


Figura 10 – Quantificação de imunorreatividade para c-Fos em neurônios ocitocinérgicos (OT; a) e vasopressinérgicos (AVP; b) do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN). As imagens representativas são apresentadas em (c), com as marcações individuais e composição final. A escala é de 200 μ m, sob magnificação de 10X, e está apresentada no canto inferior direito. Os valores estão representados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. a = $p < 0,05$ vs. controle e b = $p < 0,05$ vs. alimentação pareada (*pair-feed*). 3V = terceiro ventrículo.

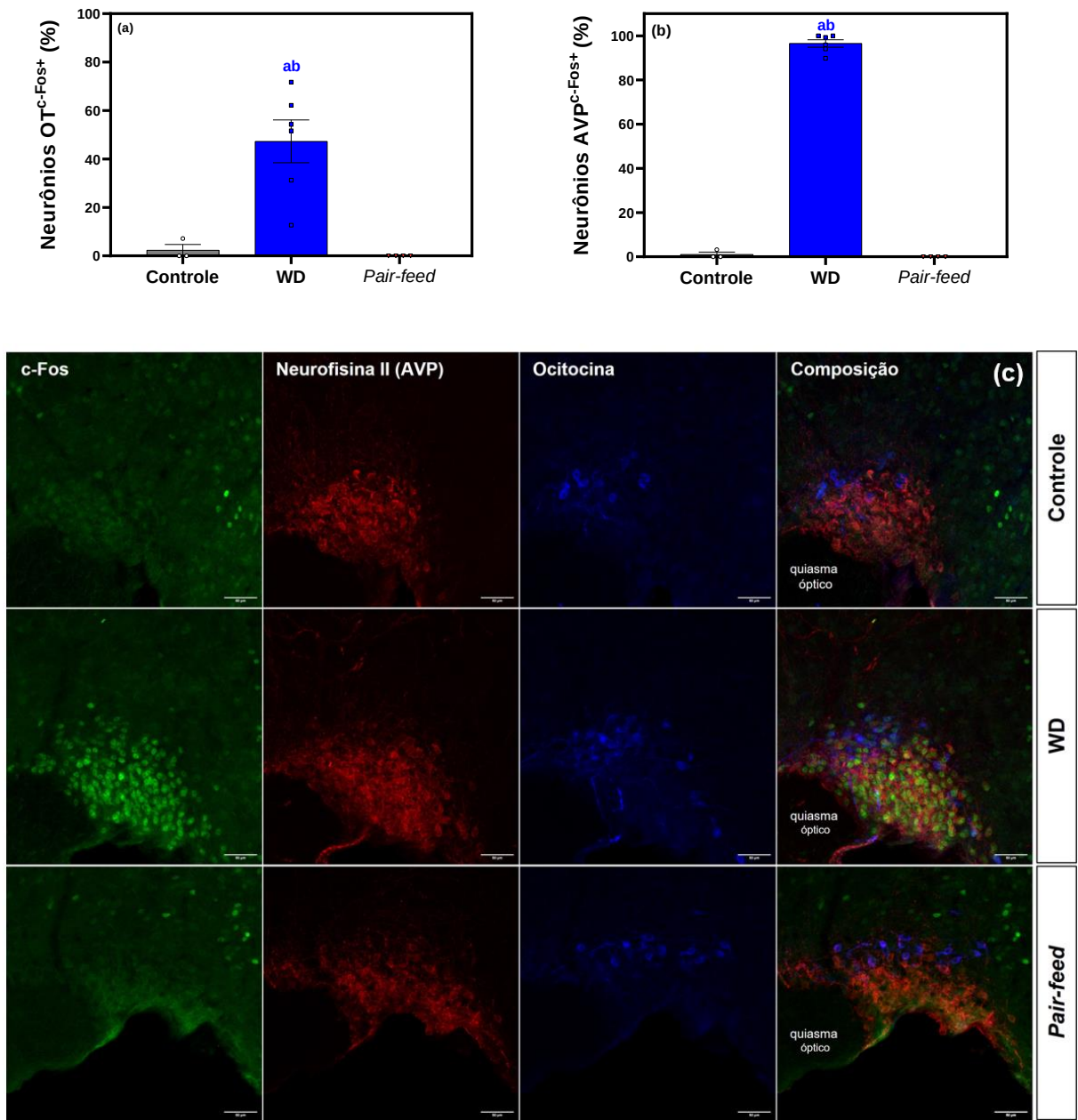


Figura 11 – Quantificação de imunorreatividade para c-Fos em neurônios OT (a) e vasopressinérgicos (b) do núcleo supraóptico hipotalâmico (SON). As imagens representativas são apresentadas em (c), com as marcações individuais e composição final. A escala é de 50 μ m, sob magnificação de 40X, e está apresentada no canto inferior direito. Os valores estão representados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. ^a = $p < 0,05$ vs. controle e ^b = $p < 0,05$ vs. alimentação pareada (*pair-feed*).

5.2. Efeito da privação hídrica de 36 h no metabolismo energético sistêmico

5.2.1. Calorimetria indireta

A fim de caracterizar o perfil de utilização de substratos energéticos no modelo de privação hídrica, submetemos os três grupos experimentais à avaliação de calorimetria indireta, por meio da qual pudemos estimar o seu consumo de oxigênio (VO_2), produção de gás carbônico (VCO_2) e calor e calcular o quociente respiratório.

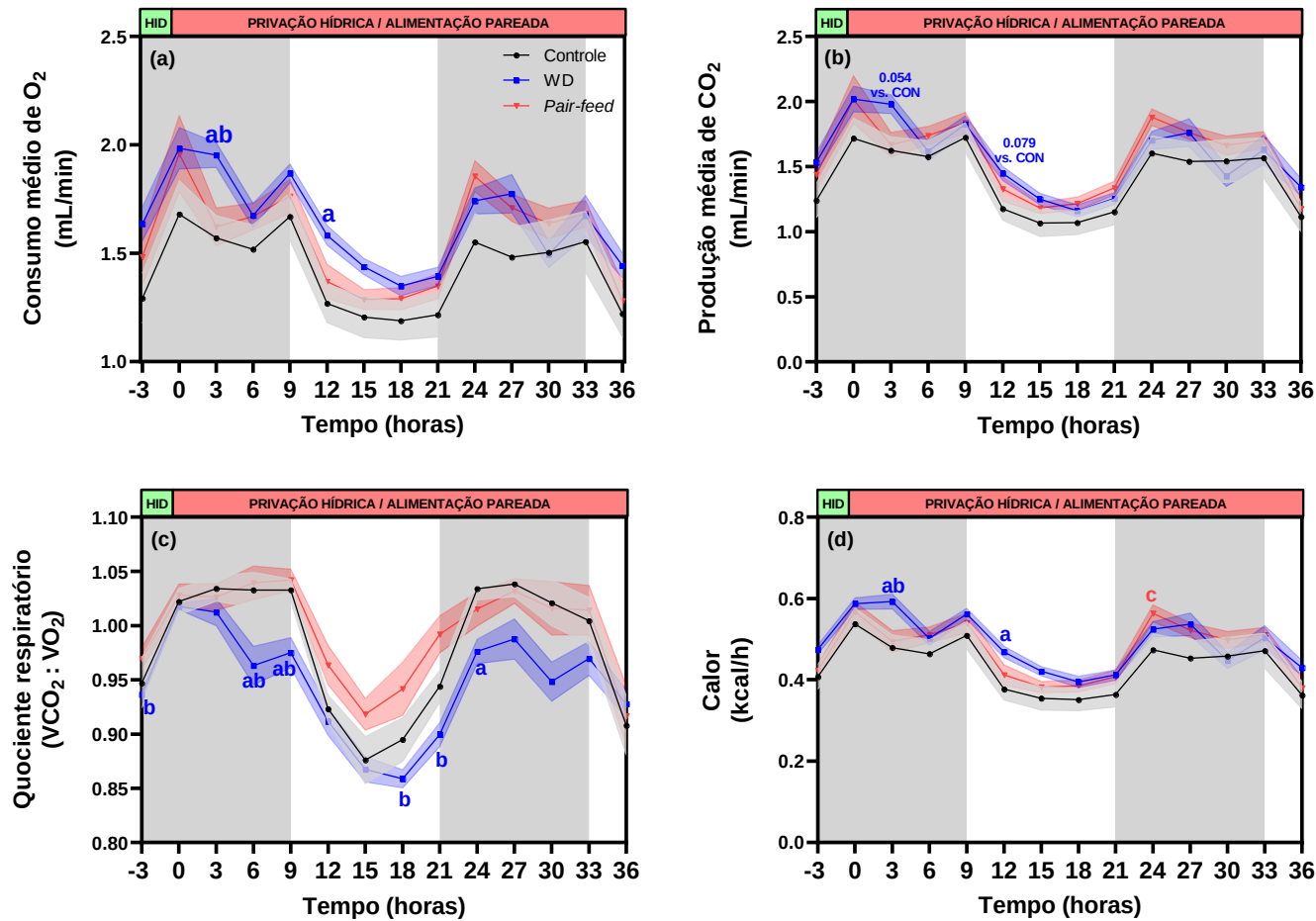


Figura 12 – Estimativa de consumo médio de oxigênio (VO_2 ; a), produção de dióxido de carbono (VCO_2 ; b), quociente respiratório (QR; c) e calor (d) de camundongos C57BL/6 machos submetidos à privação hídrica (36 h). Os valores estão representados como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. A esfericidade dos valores foi assumida positiva para dados paramétricos (calor) e negativa para dados não paramétricos (demais). (n = 7-9/grupo) ^a = p<0,05 WD vs. controle, ^b = p<0,05 WD vs. alimentação pareada (*pair-feed*) e ^c = p<0,05 alimentação pareada (*pair-feed*) vs. controle.

Nesta análise, pudemos observar aumento no VO_2 nos pontos 3h (+16,7% vs. controle – $p < 0,05$ e +20,3% vs. *pair-feed* – $p < 0,05$; figura 12a) e 12h (+25,4% vs. controle – $p < 0,05$) e, embora nenhuma alteração estatística significativa tenha sido observada em relação ao VCO_2 , notou-se uma tendência ao seu aumento nos mesmos pontos do tempo em que o VO_2 , encontrava-se aumentado (figura 13b), o que é esperado, tendo em vista que ambos os parâmetros estão interligados em um ponto de vista metabólico (Elfers et al., 2022). Enquanto o CO_2 é produzido nas reações anteriores à fosforilação oxidativa, o O_2 é utilizado comoceptor final de elétrons nessa última fase, de modo que ambas as moléculas estão diretamente envolvidas com as vias de produção de ATP a partir de substratos energéticos (Gasmi et al., 2021).

Quanto à taxa metabólica dos animais WD, notou-se uma relativa constância durante o período avaliado, visto que a produção de calor esteve homogênea, apresentando aumento estatístico (relativo ao controle) somente nos pontos 3h (+25,9% - $p < 0,01$) e 12h (+24,1% - $p < 0,05$), coincidindo com a maior VO_2 (figura 12d). Em geral, o VO_2 está diretamente relacionado ao gasto energético, uma vez que o oxigênio é necessário para o passo final da oxidação de substratos: a fosforilação oxidativa, que acontece na membrana interna da mitocôndria, e é o principal responsável pelo montante de ATP intracelular (Elfers et al., 2022). Uma vez que o organismo procura, inicialmente, corrigir o estresse imposto pela privação hídrica, é possível que o aumento observado nos parâmetros de VO_2 e calor reflita um aumento na atividade celular em diferentes tecidos visando a adaptação, similar ao que foi observado em cérebros de ratos (Koehler-Stec et al., 2000) ou, ainda, que seja decorrente de uma maior atividade do animal, em busca da água que lhe fora retirada, enquanto a alteração observada no ponto 12h possa ser resultado da transição claro-escuro. Além disso, deve-se considerar a possibilidade de aumento na frequência cardíaca em decorrência da privação de fluidos, o que por si só, também é capaz de elevar o VO_2 (Boerth et al., 1969; Massett et al., 1996), embora, neste caso, fosse esperado um aumento de forma persistente.

De modo mais proeminente, conseguimos estimar, por meio da avaliação de quociente respiratório (QR), a predominância de substrato energético sendo utilizada no momento para obtenção de energia (Irahara et al., 2018; Price & Mager, 2020). O QR (calculado como a razão entre o VCO_2 e o VO_2) é frequentemente utilizado em estudos metabólicos para estimar a predominância de substrato utilizado no

catabolismo durante determinado período. Embora alguns desvios possam ser observados, é comum que se observe valores entre 0,7 – indicativo de oxidação lipídica predominante – e 1,0 – indicativo de oxidação de glicogênio predominante –, sendo que valores intermediários a esta escala sugerem a utilização mista, isto é, carboidratos, lipídios e até proteínas (em menor proporção) (Price & Mager, 2020). Todavia, devido à presença do grupamento amina nas proteínas, a calorimetria indireta não é capaz de estimar o metabolismo proteico diretamente, afinal, o que conhecemos de estimativa para o quociente respiratório é proveniente de dados de estequiometria que estimam o consumo completo de moléculas baseadas em carbono (Irahara et al., 2018). Durante a privação hídrica de 36 h, observamos uma redução média de ~5-6% do QR, tanto em relação ao controle, quanto ao *pair-feed* nos pontos referentes à 6ª e 9ª hora (figura 12c; $p < 0,05$). Uma redução similar foi observada, novamente, à 24ª hora (-5,2% vs. controle; figura 12c; $p < 0,01$).

As principais alterações foram observadas no período noturno, quando os roedores estão naturalmente mais ativos. Conforme observado no gráfico (figura 12c), houve uma redução significativa no QR, mas que não se aproximou de 0,7, o que nos indica que provavelmente houve, nestes momentos, recrutamento de lipídios para oxidação, mas de forma simultânea à de carboidratos, que, sendo predominante, mais influenciou o QR. Tal achado é similar ao que se observa na fase inicial de jejum alimentar, em que carboidratos são utilizados como fonte predominante de energia, podendo chegar à sua depleção (Secor, 2016). É possível que o menor QR observado possa estar associado, ainda, a um quadro de resistência insulínica no modelo de WD, uma vez que já foi demonstrado previamente a relação diretamente proporcional entre a desidratação e o HOMA-IR, um indicador clínico de resistência insulínica (Min et al., 2020) e, ainda, o decréscimo de QR em modelo de resistência insulínica induzida por dieta hiperlipídica (Kothari et al., 2017).

Uma vez que os roedores são animais de hábito noturno (van der Vinne et al., 2014), sabemos que o ciclo de luminosidade influencia diretamente na atividade e metabolismo energético desses animais. Por isso, utilizando os mesmos dados de calorimetria distribuídos em linha do tempo, avaliamos a média de cada um dos parâmetros nas primeiras 12h de luz após a retirada da água, bem como 12 últimas horas de noite, antes da finalização do modelo.

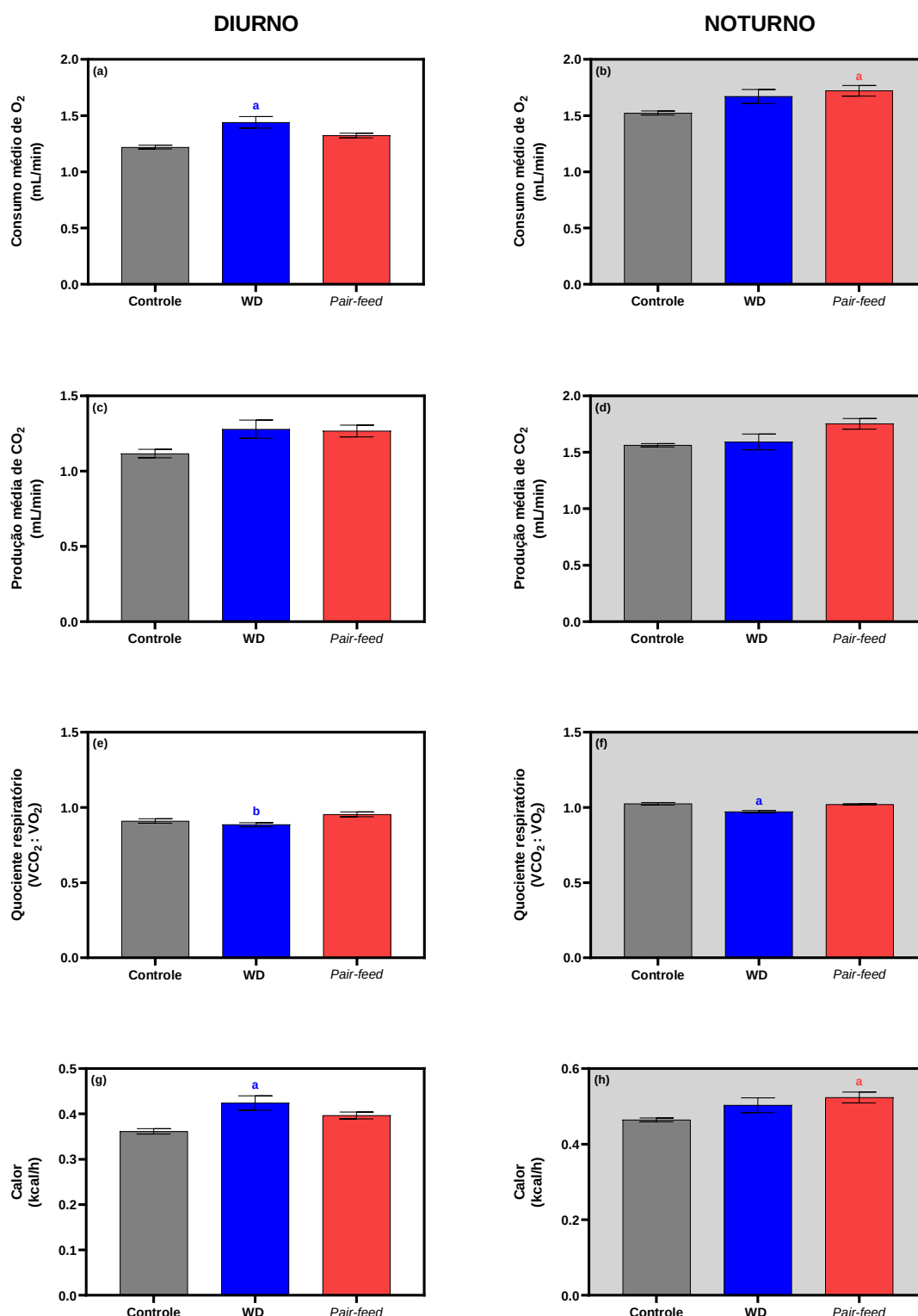


Figura 13 – Estimativa média de VO₂ (a,b), VCO₂ (c,d), QR (e,f) e calor (g,h) nas primeiras 12h de dia (diurno) e 12 últimas horas de noite (noturno) no modelo de privação hídrica (36 h) em camundongos C57BL/6 machos. Os valores estão representados como média ± EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados não paramétricos foram submetidos a teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn (quociente respiratório; noite) e os paramétricos ao teste one-way ANOVA, seguido de pós teste Bonferroni. ^a = p<0,05 vs. controle e ^b = p<0,05 vs. alimentação pareada (*pair-feed*).

Nesta feita, observamos que, em média, o VO_2 e produção de calor do WD durante o dia estavam significativamente aumentados em comparação ao controle (+18% e +17,17% nas figuras 13a e 13g, respectivamente; $p < 0,01$), enquanto só à noite notou-se alteração significativa no QR (-5,27% vs. controle; figura 13f; $p < 0,05$). Embora esperemos uma maior produção de calor quando há recrutamento de lipídios, visto que essas moléculas liberam mais energia em seu metabolismo (Elfers et al., 2022), o aumento do calor durante o dia foi observado independentemente do menor QR. Estudos prévios demonstraram que camundongos submetidos a protocolo de restrição alimentar – uma vez que precisavam completar tarefas para conseguir o alimento – apresentaram diurnidade, isto é, um desvio de seu comportamento noturno para o período claro (van der Vinne et al., 2014). Embora nosso modelo se trate de um período bem menor que o observado nesse trabalho, uma vez que observamos também uma restrição alimentar no grupo WD, é possível que o metabolismo turno-dependente destes animais também possa ter apresentado alteração, justificando a maior média de VO_2 e calor durante o dia.

5.2.2. Parâmetros morfológicos e bioquímicos

Foi relatado anteriormente que ratos submetidos a três regimes de privação hídrica (24, 48 e 72h) enquanto jejuados apresentavam intolerância à glicose e hiperglicemia associada à menor concentração de corpos cetônicos e ácidos graxos livres. A secreção *in vitro* de insulina pelo pâncreas obtido desses animais foi prejudicada de modo concentração-dependente da adição de manitol ao meio. Nesses animais, a resposta lipolítica associada à administração de norepinefrina também foi prejudicada, indicando um possível prejuízo à utilização de lipídios durante uma situação de jejum alimentar e hídrico. Desta maneira, embora não se possa dissociar completamente os achados decorrentes da privação alimentar e hídrica, postula-se que os animais desidratados possam apresentar déficit na sinalização insulinérgica, o que contribuiria para um estado catabólico durante a desidratação, mas a contribuição de outros fatores catabólicos não pode ser descartada (Gerich et al., 1973).

Baseando-nos, portanto, em que (i) a desidratação é associada à maior predisposição de doenças na terceira idade (Yoo et al., 2018); (ii) parece ser associada a perda de performance muscular durante a prática de atividade física (Cleary et al., 2006), (iii) causa estresse osmótico capaz de causar alterar o metabolismo energético (Gerich et al., 1973) e (iv) é acompanhada de hipersecreção de OT, um hormônio com potencial anti-catabólico (Santos et al., 2023; Vilhena-Franco et al., 2016), buscamos caracterizar as alterações metabólicas decorrentes do modelo de WD.

Portanto, avaliamos a massa de alguns tecidos de suma importância para o metabolismo energético – a saber, o tecido adiposo branco retroperitoneal (rTAB) e o fígado, bem como os parâmetros bioquímicos de glicemia e colesterolemia (figura 14).

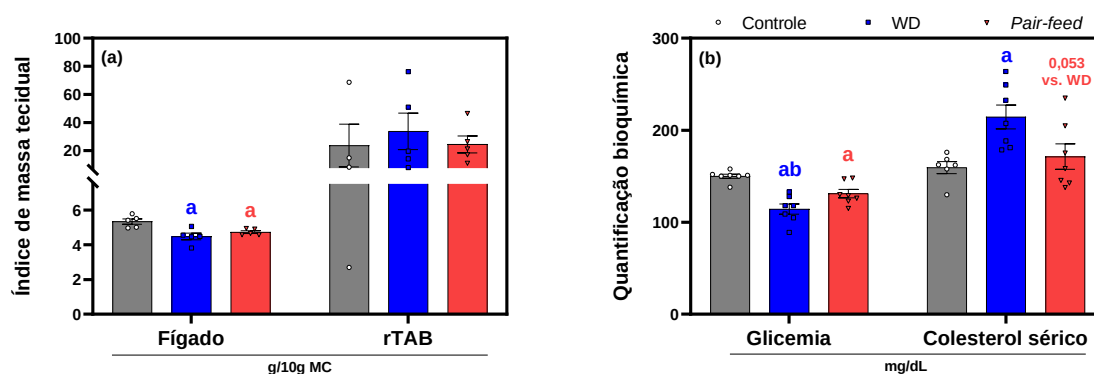


Figura 14 – Índice de massa hepática e tecido adiposo branco retroperitoneal (rTAB) (a), além de glicemia e colesterol sérico (b) de camundongos C57BL/6 machos submetidos à privação hídrica (36 h). Os valores estão representados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. ^a = $p < 0,05$ vs. controle e ^b = $p < 0,05$ vs. alimentação pareada (*pair-feed*). MC = massa corporal.

O índice de massa hepática do grupo WD reduziu em ~15,5% vs. controle ($p < 0,01$), enquanto o grupo *pair-feed* perdeu ~14,6% vs. controle ($p < 0,05$), mas não apresentou diferença significativa em comparação ao WD ($p = 0,7932$; figura 14a). Por sua vez, a massa do tecido adiposo branco retroperitoneal não se mostrou diferente entre os grupos (figura 14a; $p > 0,99$). Como observamos na análise calorimétrica, os animais WD aumentaram a produção média de calor diurno, decorrente de maior consumo de oxigênio, indicando maior degradação de substratos energéticos (figura 13a e 13g). Uma vez que o fígado é o principal órgão responsável pelo armazenamento de glicogênio (além das proteínas que sintetiza) (Adeva-Andany et al., 2016; Ozougwu, 2017), podemos inferir que a perda em sua massa seja resultante de uma mobilização desse substrato para produção de energia, especialmente quando considerando o déficit calórico oriundo da menor ingestão alimentar e, ainda, a possibilidade de disponibilização de 3 g de água metabólica para cada 1 grama de glicogênio oxidado (Fernández-Elías et al., 2015). Portanto, a glicogenólise poderia ainda ser justificada como um mecanismo de compensação para produzir um teor de água que compensasse a sua não ingestão.

Por outro lado, a despeito do potencial recrutamento de lipídeos para oxidação, não observamos alteração na massa do rTAB. Foi relatado anteriormente que a maior densidade urinária específica (USG) – indicador de baixa ingestão hídrica – esteve positivamente correlacionada à redistribuição de gordura, resultando em maior deposição abdominal, enquanto a gordura associada aos membros inferiores

esteve significativamente reduzida (Min et al., 2020). Deste modo, em nosso estudo, a fonte de lipídeos recrutada pode ter sido oriunda de outro local que não o rTAB, ou uma possível redistribuição de gordura pode ter influenciado nossa análise. Além disso, o quantitativo de lipídios utilizado durante as 36 h pode não ter sido suficiente para gerar perda de massa tecidual.

Em seguida, avaliamos dois parâmetros bioquímicos indicativos de *status* metabólico: a glicemia e a colesterolemia. Em humanos submetidos a estresse osmótico por privação hídrica e infusão contínua de salina hipertônica, observou-se desenvolvimento de hiperglicemia, que não foi acompanhada por aumento de degradação proteica sistêmica (Keller et al., 2003; Lewis, 2018). Trabalhos prévios indicam que o déficit em ingestão hídrica pode correlacionar-se positivamente com a resistência insulínica, causando prejuízo nos seus efeitos metabólicos, o que poderia justificar prontamente a hiperglicemia observada nos primeiros trabalhos (Min et al., 2020; Schliess et al., 2006).

Entretanto, em nosso modelo, observamos que a privação hídrica – associada à hiporexia por desidratação – levou à baixa de glicemia nos camundongos (-23,81% vs. controle; figura 14b; $p < 0,01$), ainda mais significativa do que no grupo *pair-feed* (-12,66% *pair-feed* vs. controle - $p < 0,05$; -12,8% WD vs. *pair-feed*; figura 14b; $p < 0,05$). Assim, por mais que a desidratação possa cursar com resistência insulínica, esse processo parece não ser observado em nosso estudo.

De fato, observou-se que em pacientes com *diabetes mellitus* tipo I que tiveram a terapia insulínica retirada por 5 horas após um período de desidratação apresentaram um desenvolvimento de hiperglicemia mais rápido que os pacientes hidratados, e que foi acompanhado de maior concentração de corpos cetônicos (Burge et al., 2001). Por outro lado, o tratamento com um diurético de alça, a furosemida, na condição de insulinopenia causado pela *diabetes mellitus* tipo II em ratos, pareceu causar apenas uma tendência à hiperglicemia após 6h de desidratação medicamento-induzida (Perry et al., 2019).

Por sua vez, Kim e colaboradores (2020) demonstraram que a restrição hídrica por 4 semanas consecutivas ocasionou em déficit glicêmico nos camundongos, mas sem alterar a concentração de insulina plasmática. Esses achados parecem ter contribuído para o menor desenvolvimento físico-cognitivo observado nos animais.

Em conjunto, esses dados apontam que o metabolismo de glicose durante a desidratação pode ser tempo-dependente: num primeiro momento, a quebra de glicogênio resulta em hiperglicemia transitória, mas a longo prazo, quando consideramos a restrição alimentar observada durante a desidratação e, ainda, o potencial recrutamento de lipídios para obtenção de energia, podemos inferir a possibilidade de cetogênese como fonte alternativa de energia à glicose, o que justificaria a hipoglicemia observada. Vale ressaltar que a OT, sabidamente recrutada em situação de restrição hídrica (Wakerley et al., 1978), também possui potencial lipolítico e, portanto, pode estar contribuindo para o recrutamento de lipídios para oxidação durante a desidratação (Yuan et al., 2020). Não se pode, todavia, descartar a possibilidade de que a desidratação prejudique a capacidade hepática de gliconeogênese. Uma análise prévia revelou que a perfusão de fígado isolado de ratos com solução salina hipertônica foi capaz de reduzir a expressão do RNAm codificador para a enzima fosfenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), que possui papel chave no processo de gliconeogênese (Newsome et al., 1994).

Além da glicemia, observamos que os camundongos desidratados apresentaram hipercolesterolemia (+20,1% vs. controle; figura 5b; $p < 0,01$) e esse efeito foi independente da restrição alimentar, uma vez que o colesterol no grupo *pair-feed* não diferiu do controle ($p > 0,99$ vs. controle).

É notável que situações adversas de estresse culminam com aumento de corticosterona, que pode modular o metabolismo de lipídios, inclusive induzindo síntese de colesterol (Duan et al., 2014; Zaytsoff et al., 2019). A desidratação é uma dessas situações (Bekkevold et al., 2013). Neste caso, no entanto, esperaríamos uma hiperglicemia associada, o que não foi observado em nosso estudo.

Entretanto, Campbell et al., (1994) também observaram que o jejum alimentar associado à restrição hídrica resultou em maior conteúdo de colesterol total, HDL, LDL e apolipoproteínas A-1 e B, indicando que a variabilidade no *status* de hidratação – *per se* – pode contribuir para uma flutuação no perfil lipídico, embora não tenham discutido profundamente sobre as consequências fisiológicas desse achado.

Mais recentemente, Alvira-Iraizoz et al., (2021) confirmaram, por meio de análise multiômica que dromedários submetidos a protocolo de desidratação também apresentavam maior conteúdo plasmático de colesterol, que retornava ao nível basal quando os animais eram reidratados. A hipercolesterolemia foi associada, no córtex e medula renais, a um menor conteúdo de colesterol na membrana celular que, por sua

vez, se correlacionou positivamente à alteração na expressão gênica de uma série de canais de íons, bem como para os transportadores de água AQP1, AQP2 e AQP3, indicando-nos que a composição da membrana plasmática é alterada em decorrência da desidratação para comportar maior transporte de água.

Concordantemente, constatou-se que a saturação de colesterol numa membrana artificial, associada à maior espessura desta, foi inversamente proporcional à permeabilidade de água através das isoformas M1 e M23 do transportador para água AQP4, isto é, quanto maior a proporção de colesterol, menor foi o transporte transmembrana de água (Tong et al., 2012).

Em conjunto, esses dados nos sugerem que a hipercolesterolemia observada durante a desidratação pode ser também um resultado da liberação de lipídios pela membrana celular, numa tentativa de tornar-se mais permeável à água na situação de estresse osmótico. Vale ressaltar que o ME, um dos tecidos de maior extensão do corpo (Baehr et al., 2014), e em particular, músculos predominantemente glicolíticos, apresentam uma alta expressão de AQP4 (Kim et al., 2023) e, portanto, podem necessitar de modulação na permeabilidade de membrana para o transporte de água adequado durante a desidratação, o que seria obtido por meio de liberação do colesterol para a circulação (Alvira-Iraizoz et al., 2021).

Por meio dos dados discutidos até o momento, conseguimos melhor discutir as alterações causadas no metabolismo energético sistêmico durante um estado de privação hídrica. No entanto, uma vez que o teste de calorimetria indireta se baseia na estimativa de oxidação de moléculas baseadas em carbono, isto é, carboidratos e lipídios, não conseguimos somente por meio dele estimar a atividade do metabolismo proteico (Irahara et al., 2018). Deste modo, e sabendo que (i) o ME é possuidor do maior *pool* de aminoácidos livres (Bergström et al., 1974) e proteínas; (ii) é altamente plástico e adapta-se rapidamente a estímulos diversos (Cervone et al., 2023); e (iii) expressa receptores para OT, que possuem potencial anti-catabólico, e o RNAm para esse receptor principalmente em músculos oxidativos (Breton et al., 2002; Costa et al., 2021), buscamos investigar o efeito direto da privação hídrica de 36 h sobre o metabolismo de proteínas musculares e a sinalização ocitocinérgica do músculo esquelético.

5.3. Efeito da privação hídrica de 36 h no metabolismo proteico muscular

5.3.1. Fenótipo oxidativo

Anteriormente, foi demonstrado que o músculo soleus, com fenótipo predominantemente oxidativo possui maior expressão relativa do RNAm para o OTR (Costa, 2019). Por isso, e considerando a hipersecreção de OT durante a desidratação (figuras 10 e 11), investigamos inicialmente as alterações da privação hídrica no músculo soleus, cuja função poderia mais provavelmente ser modulada pela sinalização ocitocinérgica.

Idealmente, ao avaliar-se a massa de um tecido, especialmente aqueles que podem alterá-la de acordo com a demanda energética, é recomendado que se utilize um índice, que padroniza a massa tecidual por um outro parâmetro relacionado e constante. Rotineiramente, o índice de massa muscular é apresentado como a razão entre massa muscular e corporal (Edström et al., 2007). Por isso, avaliamos a massa relativa do soleus após WD de 36 h; no entanto, não observamos alteração significativa entre os grupos (figura 15; $p=0,93$), indicando um possível mecanismo de adaptação responsável pela manutenção da massa muscular.

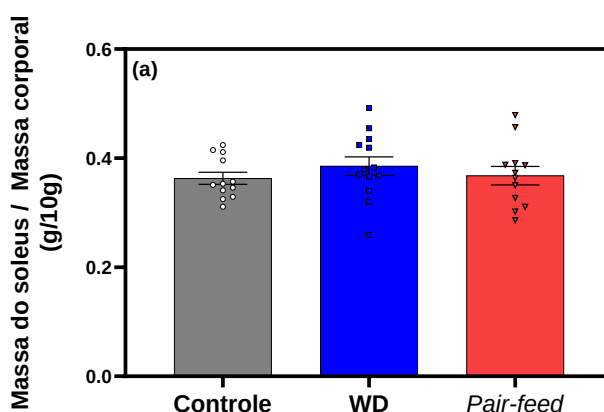


Figura 15 – Massa relativa do músculo oxidativo soleus de camundongos C57BL/6 machos submetidos à privação hídrica (36 h). Os valores estão representados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

Estudos prévios têm demonstrado dados bastante heterogêneos quanto ao efeito da desidratação induzida por exercício na massa muscular: em um modelo de desidratação induzida por exercício prolongado em alta temperatura, amostras do

músculo vasto lateral permaneceram com o mesmo volume de água imediatamente após o exercício quando comparado ao início. No entanto, após 1 hora de repouso, seu conteúdo de água reduziu, ao passo que o volume plasmático retornou ao normal (Mora-Rodríguez et al., 2015). Por outro lado, quando um grupo de indivíduos foi submetido a um protocolo de ciclismo, apresentaram perda de volume do músculo vasto lateral aos 30 min. após exercício, enquanto o mesmo achado não foi observado em músculos não recrutados para o exercício (Hackney et al., 2012). Esses dados indicam que o conteúdo de água muscular é dinâmico e, numa situação de privação hídrica, pode variar de maneira tempo-dependente para contribuir com a reposição de volume plasmático.

Ainda assim, são poucos os trabalhos em literatura que se utilizaram de um modelo *in vivo* em condições de repouso após privação hídrica, para investigar os efeitos no ME. A conhecimento do autor, Farhat et al. (2018) foi o único a propô-lo recentemente, mas os mecanismos moleculares envolvidos nessa interação ainda não são totalmente elucidados, embora tenham sido parcialmente discutidos num modelo similar, de perda de água por desidratação em sapos (Luu et al., 2020).

Uma vez que os animais WD apresentaram menor ingestão alimentar, à semelhança dos camundongos *pair-feed*, mas nenhum dos grupos demonstrou perda na massa do soleus, postulamos que as causas de tal achado possam estar relacionadas a (i) uma retenção de fluidos no músculo soleus, em resposta à privação hídrica, num mecanismo de autoproteção ou (ii) a ausência de alterações significativas que decorressem em perda de massa nos dois grupos.

Deste modo, e considerando que o ME é formado majoritariamente por proteínas, procuramos investigar o efeito direto da desidratação na taxa proteolítica total dos músculos soleus. Observamos que, a despeito da não alteração em sua massa, os músculos de animais WD apresentaram aumento na proteólise total de ~48% em relação ao controle (figura 16a; $p < 0,05$), que é pelo menos parcialmente explicado pela maior atividade do sistema proteolítico dependente de UPS (+106,25% vs. controle; figura 16b; $p = 0,015$). Por outro lado, o grupo *pair-feed* não teve maior atividade proteolítica total ($p > 0,99$ vs. controle) ou proteassomal ($p = 0,1584$ vs. controle).

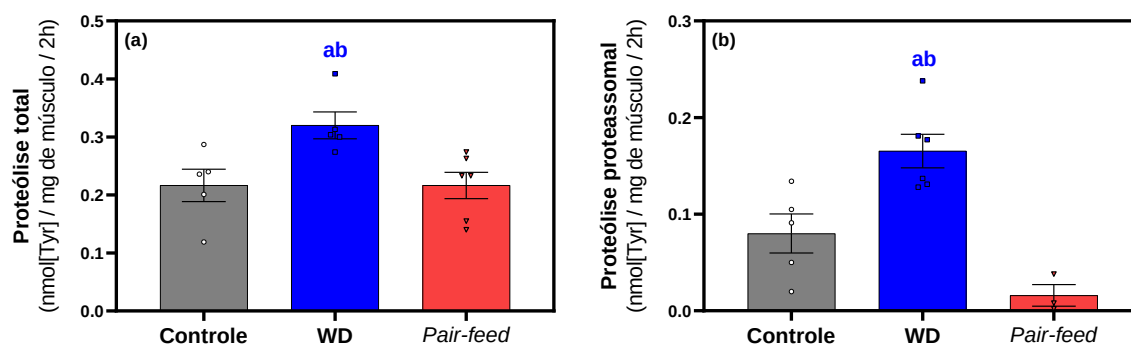


Figura 16 – Efeito da privação hídrica de 36 h na taxa proteolítica total (a) e proteassomal (b) de músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos. Os valores estão representados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. a = $p < 0,05$ vs. controle e b = $p < 0,05$ vs. alimentação pareada (*pair-feed*).

Foi relatado previamente que a desidratação induzida por 24, 48, 72 ou 96 horas em camundongos foi capaz de aumentar a concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (isto é, isoleucina, leucina e valina; BCAA) no fígado, num possível mecanismo de atenuação do estresse oxidativo, uma vez que esses aminoácidos possuem potencial antioxidante (Cui et al., 2015). Embora não tenhamos quantificado esses aminoácidos no presente estudo, é possível que um mecanismo similar seja observado no ME, o que justificaria – pelo menos parcialmente – o aumento na proteólise do soleus WD como mecanismo para disponibilização de BCAA para o fígado. No entanto, é possível que a privação de água, embora tenha induzido a proteólise muscular independente da restrição alimentar, não tenha disponibilizado aminoácidos de forma suficiente para gliconeogênese hepática, já que a glicemia do grupo WD permaneceu diminuída em relação ao controle.

Ainda, no estudo de Cui et al., (2015), observou-se manutenção na atividade de aspartato aminotransferase (AST) por até 72h de privação hídrica. Embora a AST seja tipicamente um marcador indicativo de perfusão e função hepática, sua atividade também é observada de modo significativo em outros tecidos, como o ME (Isik et al., 2018). Deste modo, podemos sugerir que a manutenção na atividade sérica desta enzima é indicativa de manutenção da função tecidual, não somente do fígado, como também dos outros tecidos que a produzem (Cui et al., 2015).

É válido ressaltar que o transporte de aminoácidos contribui diretamente para o gradiente eletroquímico e osmótico dentro da célula, ou seja, quando os aminoácidos são transportados para dentro da célula, a água tende a acompanhá-los,

levando a um aumento no volume celular (Haussinger, 1993). Deste modo, o aumento na proteólise observado pode também ter como objetivo o aumento no número de partículas osmoticamente ativas (i.e., os aminoácidos liberados) no ambiente intracelular afim de promover retenção de água no sarcoplasma, o que poderia justificar a ausência de alteração na massa relativa do soleus em nosso estudo. De fato, observou-se previamente que uma cultura de fibroblastos humanos em um meio com restrição de aminoácidos apresentou redução de 30% do volume celular após 6 h de privação, e que a simples adição de prolina ao meio foi capaz de restaurar o volume celular rapidamente, indicando uma relação direta entre os fatores volume celular e gradiente de aminoácidos (Franchi-Gazzola et al., 1999).

Amostras de fígado de ratos submetidas a perfusão com solução enriquecida com glutamina (um aminoácido), desenvolvem um aumento súbito no volume celular, acompanhado por alteração na atividade de alguns canais iônicos na membrana, indicando que, de fato, o gradiente osmótico causado pelo excesso de aminoácidos no compartimento citoplasmático é suficientemente capaz de causar retenção do fluido intracelular, que, por sua vez, modifica a atividade de transporte iônico numa tentativa de estabilizar o volume celular, visto que alguns transportadores são acoplados entre íons e aminoácidos (Haussinger et al., 1994).

É sabido, ainda, que alguns aminoácidos modulam positivamente a atividade da sinalização dependente de mTORC1 (Takahara et al., 2020). Além disso, acredita-se que esta via seja negativamente regulada em situações de diminuição de volume celular (Schliess et al., 2006). Desta maneira, a manutenção da disponibilidade de aminoácidos no sarcoplasma em decorrência do aumento na degradação proteica pode funcionar como um mecanismo de retroalimentação, a fim de manter a sinalização dependente de mTOR, ao mesmo tempo que mantém o volume da célula. Este achado poderia, ainda, justificar a manutenção da massa tecidual mesmo durante a desidratação.

Por outro lado, a proteólise pode, ainda, ser mediada pela sinalização dos glicocorticoides endógenos, que possuem potencial pró-catabólico e são hipersecretados durante a privação hídrica (Schakman et al., 2013; Yadawa & Chaturvedi, 2016), embora não tenham sido mensurados em nosso estudo. No entanto, vale ressaltar novamente que neste caso, esperaríamos observar uma hiperglicemia associada, o que não foi o caso.

Estabelecemos, então, as seguintes possibilidades: (a) o aumento da proteólise ainda não foi suficiente para resultar em perda de massa, mas isso poderia acontecer se a privação se estendesse por mais tempo; (b) a privação hídrica poderia reduzir a síntese proteica, a fim de manter o pool de aminoácidos e volume celular, justificando a manutenção da massa; (c) a privação hídrica induz a maior expressão de canais de água na membrana da célula, a despeito do metabolismo energético, numa tentativa de manter seu volume e, portanto, diminuir os efeitos deletérios associados à perda excessiva de fluidos.

Para isso, avaliamos a taxa de incorporação de puromicina em proteínas recém-sintetizadas de músculos soleus obtidos de camundongos desidratados e com alimentação pareada. Devido à sua similaridade com o RNA transportador para tirosina, a puromicina é incorporada a cadeias nascentes de peptídeos, que podem ser detectadas e quantificadas a partir de imunomarcagem específica. No entanto, não observamos alteração na incorporação deste marcador entre os grupos ($p = 0,9804$ WD vs. controle e $p = 0,5094$ *pair-feed* vs. controle; figura 17).

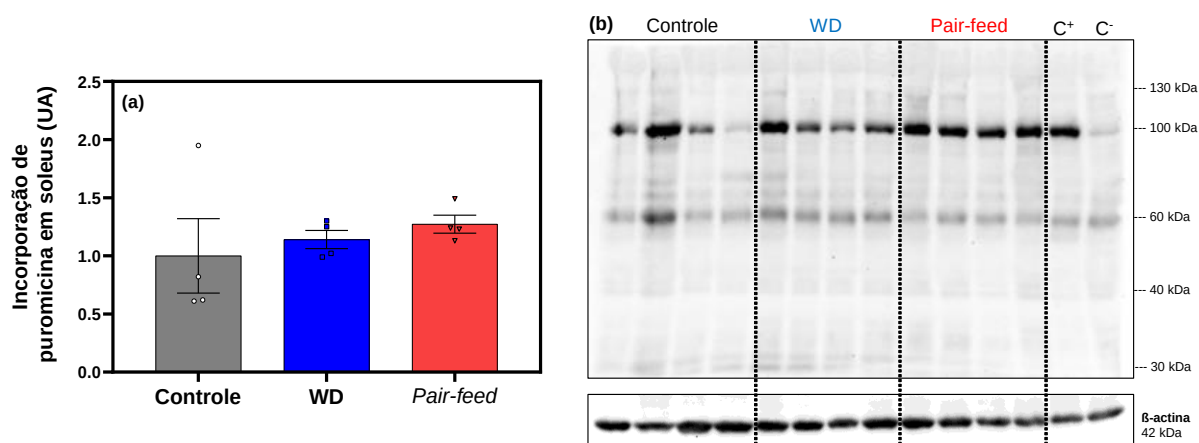


Figura 17 – Efeito da privação hídrica (36 h) na síntese proteica em músculos soleus (a), mensurada pela incorporação de puromicina em proteínas recém-sintetizadas. A imagem representativa do western blotting é apresentada em (b). C+ e C- indicam controle positivo e negativo, respectivamente (vide metodologia). Os valores estão apresentados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn.

Procuramos, então, investigar o efeito da privação hídrica de 36 h sobre a via de sinalização intracelular majoritariamente envolvida com a regulação do metabolismo muscular, dependente da proteína quinase Akt. Pode-se observar a seguir que os camundongos WD apresentaram queda na expressão da isoforma p-

Akt^{Ser473} (-72,5% vs. controle; $p < 0,01$), que foi observada também no grupo *pair-feed* (-80,6% vs. controle; figura 18; $p < 0,01$). Em consequência, a expressão de p-FoxO1^{Ser256}, alvo direto da Akt, também foi reduzida (67% WD vs. controle; figura 18; $p < 0,05$), mas não no grupo *pair-feed* ($p < 0,23$ vs. controle). Além disso, a expressão de p-FoxO3A^{Ser253} permaneceu inalterada ($p > 0,99$ vs. controle).

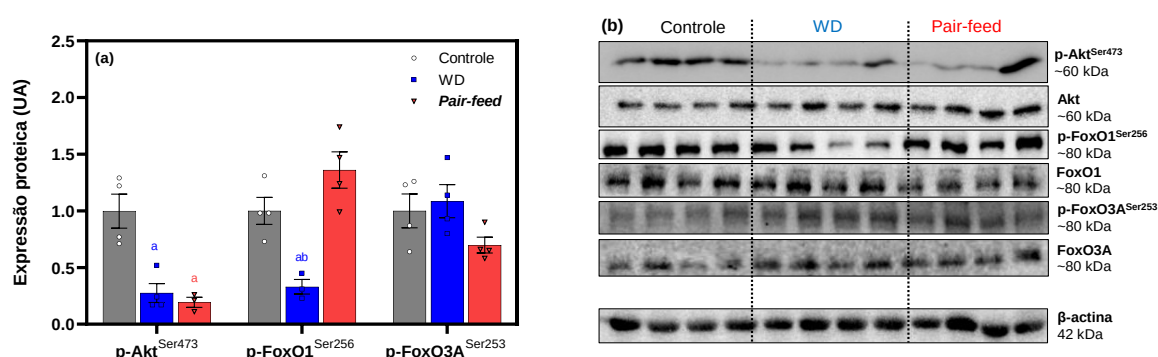


Figura 18 – Efeito da privação hídrica de 36h na expressão de isoformas fosforiladas das proteínas Akt e FoxO (a) em músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos. As imagens representativas do western blotting são apresentadas em (b). Os valores estão apresentados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. ^a = $p < 0,05$ vs. controle e ^b = $p < 0,05$ vs. alimentação pareada (*pair-feed*).

A Akt é uma proteína-chave na regulação da massa muscular, uma vez que coordena os processos de síntese proteica – modulando a atividade de mTORC1 ou GSK3 β , por exemplo – e degradação proteica, inibindo a atividade do fator de transcrição FoxO por meio da sua translocação núcleo-citoplasmática quando é fosforilado (Manning & Toker, 2017). Naturalmente, poder-se-ia esperar que diante de uma menor ativação da Akt, a inativação da FoxO, que costumeiramente a segue, seja também reduzida. Embora não tenhamos observado alteração no conteúdo fosforilado de FoxO3A, a menor inativação de FoxO1 pode ser suficiente para justificar um aumento na degradação proteica, uma vez que esse fator estimula a atividade de ambos os sistemas proteolíticos UPS e autofágico e já foi demonstrado que ativação individual de apenas uma isoforma de FoxO é suficiente para induzir atrofia muscular (Schachter et al., 2012). Além disso, deve-se destacar que outros fatores intracelulares, a exemplo da AMPK, também contribuem para a regulação do metabolismo proteico muscular de forma independente da via de sinalização Akt/FoxO e, assim, também podem contribuir para o aumento na proteólise sem depender de FoxO (Krawiec et al., 2007).

Uma vez que observamos maior atividade proteolítica mediada pelo UPS e maior atividade de FoxO1 (estimado pela sua menor fosforilação), decidimos avaliar a expressão de proteínas envolvidas com esse sistema, a saber, MuRF-1, uma ubiquitina-ligase (E3) e as cadeias peptídicas marcadas com poli-ubiquitina. Todavia, a expressão desses marcadores permaneceu inalterada entre os grupos (figura 19; $p > 0,05$), indicando que não houve maior expressão deles mesmo numa situação de hiperatividade do sistema, indicando que a estimulação do UPS em músculos de animais desidratados é independente do aumento na expressão de MuRF-1.

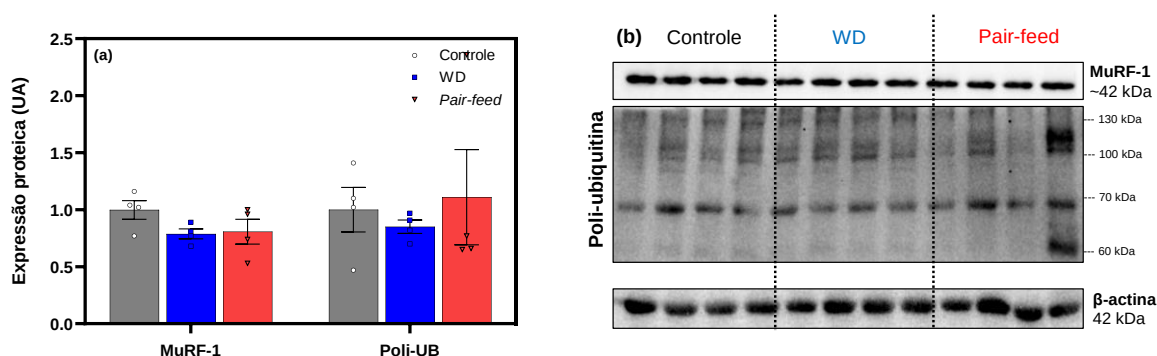


Figura 19 – Efeito da privação hídrica (36 h) na expressão de marcadores da via proteolítica dependente de ubiquitina-proteassoma, isto é, MuRF-1 e cadeias poli-ubiquitinadas (a) em músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos. As imagens representativas do western blotting são apresentadas em (b). Os valores estão apresentados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

Nossos dados são similares aos de estudo realizado em ME obtido de sapos *Xenopus laevis*, no qual se observou que dois regimes de desidratação (médio – 15% – e alto – 30% – de perda de água) foram incapazes de causar alteração na expressão de MuRF-1, embora a expressão de outra Ub-ligase, a atroquina-1 tenha apresentado menor expressão no regime de alta desidratação (Luu et al., 2020). Anteriormente, foi observado que a hipertrofia decorrente de treinamento funcional foi acompanhada de maior síntese proteica e maior atividade da subunidade 26S proteassomal, mas de forma independente da expressão de MuRF-1 e atroquina-1 (Baehr et al., 2014). Além disso, a ubiquitinação é um processo de modificação pós-translacional com regulação dinâmica, já que as proteínas são constantemente ubiquitinadas e desubiquitinadas (Sun & Zhang, 2022). Deste modo, é possível que outras Ub-ligases estejam envolvidas com a hiperatividade do UPS observada em nosso modelo e que métodos

mais sensíveis de detecção de cadeias poli-ubiquitinadas possam ser necessários para demonstrar a dinâmica de ubiquitinação na desidratação.

Ainda que não tenhamos quantificado suas atividades diretamente, sabemos que outros sistemas contribuem para a degradação de proteínas, especialmente em situações estressoras. Por isso, quantificamos a expressão de dois marcadores relacionados à atividade do sistema autofágico-lisossomal no soleus: a proteína Sequestossoma-1 (também conhecida como proteína ligadora de ubiquitina p62) e a proteína LC3, em sua forma pré e pós-lipidada (isto é, adicionada de fosfatidiletanolamina). Similar ao observado quanto aos marcadores do sistema proteassomal, não observamos alteração na expressão das proteínas vinculadas à proteólise autofágica (figura 20; $p > 0,05$).

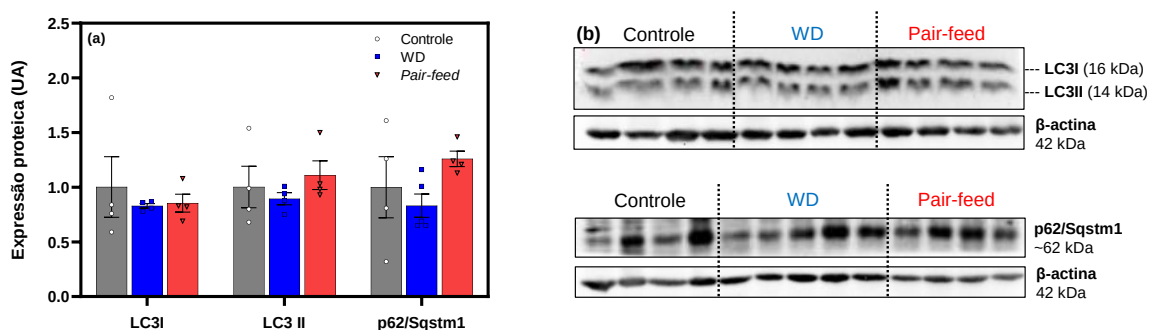


Figura 20 – Efeito da privação hídrica (36 h) na expressão de marcadores da via autofágica-lisossomal (a) em músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos. As imagens representativas do western blotting são apresentadas em (b). Os valores estão apresentados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

Em suínos submetidos a estresse térmico por 1 ou 3 dias, notou-se um acúmulo de autofagossomos no músculo semitendinoso, como representado pelo maior conteúdo de p62 e LC3II nessas amostras (Brownstein et al., 2017). Embora este modelo não seja completamente similar, espera-se que a desidratação seja consequente à hipertermia. Por isso, esperávamos resultados similares em nosso modelo. Diante da não ocorrência de maior expressão desses marcadores, inferimos que a atividade autofágica se manteve constante durante a desidratação ou, ainda, que sua atividade possa ser tempo-dependente, e predomine em um outro momento anterior da desidratação, que não tenhamos avaliado.

Considerando ainda a hipótese de que durante a privação hídrica de 36 h o músculo possa reter água numa tentativa de proteção e/ou adaptação diante da situação de estresse osmótico, o que, inclusive, poderia ser responsável por não termos observado alteração na síntese proteica (figura 17), procuramos avaliar a expressão do transportador para água AQP4.

Durante a hipertrofia muscular, espera-se um aumento na área de secção transversa do músculo, resultante de maior síntese proteica. No entanto, estudos prévios demonstraram que o aumento da área a curto-prazo após sessões de treinamento de resistência em indivíduos sedentários foi influenciado majoritariamente não pelo aumento de conteúdo proteico, mas pelo edema induzido pela injúria no tecido muscular. Deste modo, é realmente possível que o teor de fluido muscular interfira ativamente na área e ainda na massa muscular (Damas et al., 2016). Embora não se saiba completamente a importância funcional da AQP4 no ME para além do transporte de água, sua deficiência já foi associada à perda de massa muscular e, ainda, distrofias musculares, demonstrando que possui um papel fundamental para esse tecido (Chung et al., 2020).

Todavia, ao avaliarmos a expressão do transportador para água AQP4 neste músculo, não encontramos variação significativa resultante da privação hídrica ($p > 0,99$ vs. controle; figura 21), sugerindo-nos que esta possa não ser a razão pela qual o soleus mantém sua massa intacta. É possível, ainda, que a privação hídrica module a expressão de outro(s) canal(is) para água, como a AQP1, que é expressa nos capilares do ME (Aslesh et al., 2023), mas não foi avaliada no presente estudo.

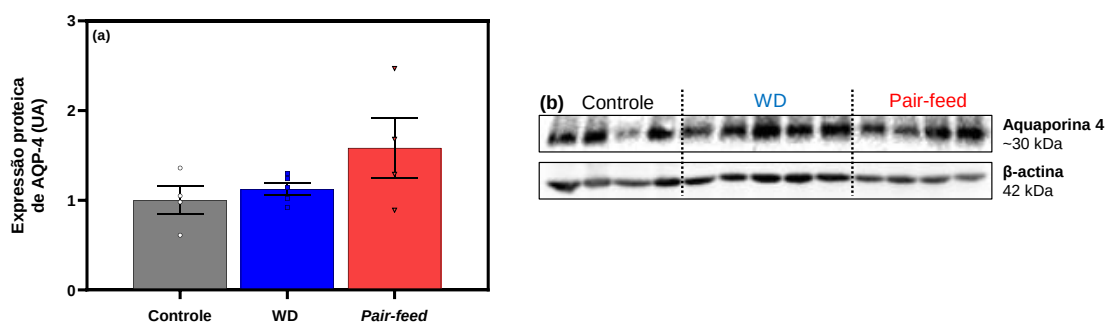


Figura 21 – Efeito da privação hídrica (36 h) na expressão do canal de água aquaporina 4 (a) em músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos. As imagens representativas do western blotting são apresentadas em (b). Os valores estão apresentados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

No ME, as AQP4 organizam-se na membrana num molde particular, denominado “arranjo ortogonal de partículas” (OAP), que consiste em ajuntamentos da isoforma M23 do canal, delimitadas pelas isoformas M1 na periferia. Outros canais como a AQP1, por exemplo, distribuem-se de modo mais uniforme na membrana, mas é possível que o arranjo das aquaporinas contribua de maneira tão significativa para sua capacidade de transporte de água quanto sua maior expressão (Nicchia et al., 2013). Assim, é possível que o fluxo de água pelos canais esteja aumentado mesmo com a expressão mantida constante, especialmente se a saturação de colesterol na membrana sarcoplasmática realmente sofrer alteração decorrente da privação hídrica. No entanto, não avaliamos esses parâmetros diretamente nesse estudo.

Alternativamente, estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que a estimulação farmacológica do OTR em ME oxidativo de ratas resultou em menor atividade de ambos os sistemas proteolíticos proteassomal e autofágico (Costa et al., 2021), além de reduzir a expressão de MuRF-1 e atrogina-1 numa situação de atrofia muscular induzida por secção do nervo ciático (Costa, 2019). Portanto, uma vez que os resultados obtidos em nosso laboratório (i) demonstraram papel anti-catabólico no metabolismo de proteínas em músculos de ratas e, ainda, (ii) observamos um aumento na atividade dos neurônios secretores de OT no SON e PVN (figuras 10 e 11) procuramos confirmar se o mesmo efeito anti-catabólico seria observado em músculos oxidativos de camundongos e, ainda, se a estimulação ocitocinérgica seria modulada no modelo de WD, a fim de exercer um efeito protetor.

Para tanto, incubamos músculos soleus com três diferentes concentrações (10^{-7} a 10^{-5} M) de um agonista não peptídico para OTR, o WAY-267,464 e observamos uma redução expressiva na proteólise total, correspondente a -29,8% (10^{-5} M vs. controle; $p < 0,01$), -18,60% (10^{-6} M vs. controle; $p < 0,05$) e -24,84% (10^{-7} M vs. controle; $p < 0,01$) respectivamente (figura 22a), confirmando o potencial anti-catabólico desta via de sinalização também em músculos oxidativos de camundongos. Similarmente, a incubação com a menor concentração da droga foi capaz de atenuar a proteólise proteassomal em -68,9% vs. controle (figura 22b; $p < 0,01$).

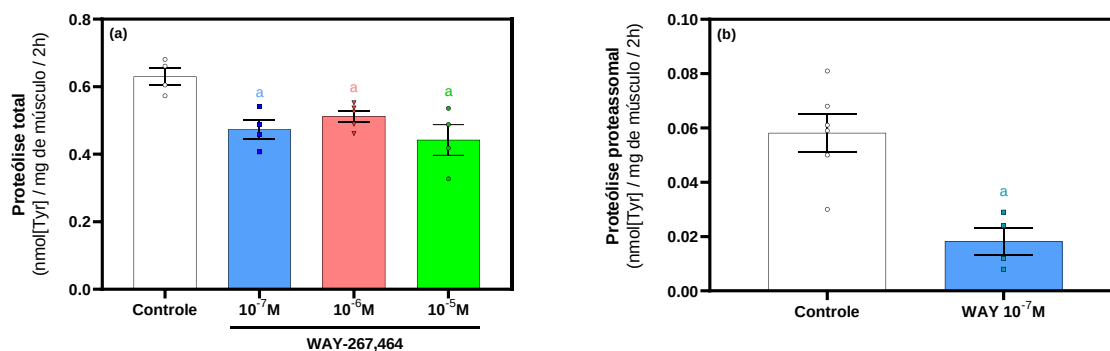


Figura 22 – Efeito da incubação com o agonista para OTR, o WAY-267,464, em concentrações distintas sobre a proteólise total (a) e proteassomal (b) em músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos em situação basal. Os valores estão apresentados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. ^a = $p < 0,05$ vs. controle.

Assim sendo, e ainda considerando que a OT vem sendo bastante estudada no que tange à sua contribuição na regulação do metabolismo energético e metabolismo de proteínas musculares (Costa, 2019; Lee et al., 2008; Santos et al., 2023), postulamos a possibilidade de que em nosso modelo, a sinalização OTérgica muscular pudesse estar hiperativa, numa tentativa de atenuar o efeito pró-catabólico observado em nossas análises (figuras 16 e 18). Inclusive, seu possível efeito protetor poderia ser responsável por não termos observado aumento na expressão dos marcadores dos sistemas proteolíticos. Portanto, avaliamos a expressão proteica do OTR no músculo soleus, bem como estimamos a atividade da PKC, efetora da estimulação ocitocinérgica em músculos oxidativos (Santos et al., 2023). Todavia, notamos que não houve alteração significativa na expressão desses dois marcadores (figura 23; $p > 0,99$), sugerindo que a OT / sinalização ocitocinérgica não module o metabolismo muscular durante a desidratação.

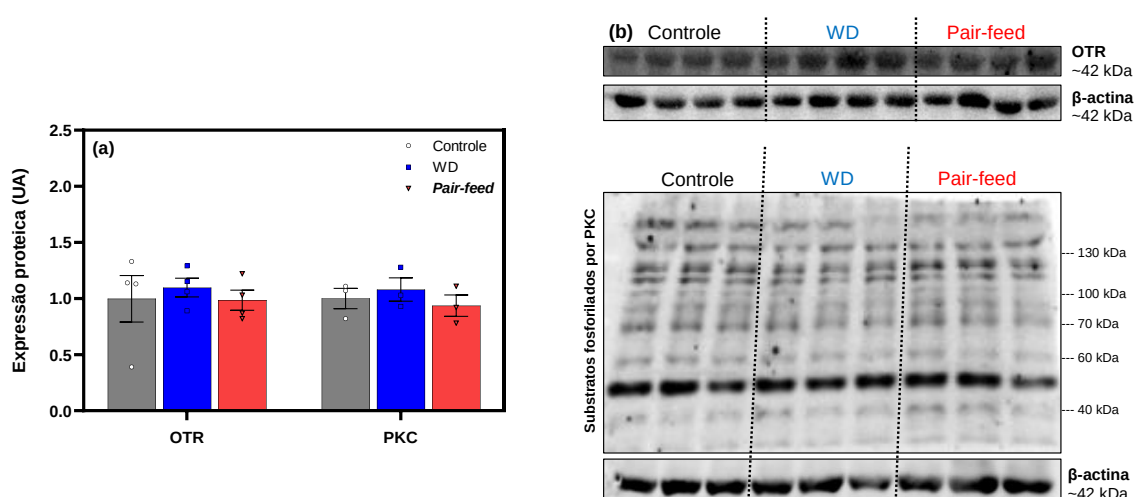


Figura 23 – Efeito da privação hídrica (36 h) na expressão do receptor para ocitocina e substratos fosforilados para PKC (a) em músculos soleus obtidos de camundongos C57BL/6 machos. As imagens representativas do western blotting são apresentadas em (b). Os valores estão apresentados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

Estudos prévios demonstraram que a estimulação com esteroides sexuais, mais precisamente a trembolona (andrógeno) e estradiol (estrógeno) foi capaz de induzir proliferação e diferenciação das células satélite do ME de forma dependente da OT (Zhang et al., 2019), induzindo sua maior produção no ME, bem como um aumento na concentração circulante desse peptídeo, o que poderia mediar o efeito anabólico dos esteroides (De Jager et al., 2011; Kongsuwan et al., 2012). No entanto, observou-se que a expressão de OTR no músculo esquelético parece ser maior em camundongos fêmeas recém-nascidos, quando comparado a machos (Aiken, 2019) e, ainda, que no sistema nervoso central, a ativação de receptores para andrógeno em neurônios secretores de OT do PVN reduziu significativamente a expressão do gene codificante para este peptídeo (Dai et al., 2017). Deste modo, é possível que a sinalização ocitocinérgica, e/ou sua secreção por núcleos hipotalâmicos sofra de particularidades associadas ao gênero. Portanto, constitui-se uma limitação deste estudo que a sinalização no músculo durante a privação hídrica tenha sido avaliada apenas em machos. Além disso, observou-se previamente que a mudança na composição de ácidos graxos na membrana de células cultivadas de miométrio humano é capaz de modular a atividade da sinalização ocitocinérgica (Kim et al., 2012). Considerando que os nossos resultados de calorimetria sugerem recrutamento

de lipídeos para oxidação, é possível que o processo possa ter interferido na atividade dos OTR em nosso modelo.

É válido mencionar, ainda, que embora seu papel não tenha sido relacionado diretamente à regulação do metabolismo energético e/ou proteico no ME, a sinalização da vasopressina através de seu receptor V1a nesse tecido possui potencial pró-regenerativo (Moresi et al., 2009; Toschi et al., 2011). Deste modo, é possível que não a OT, mas a vasopressina, também hipersecretada durante a desidratação (figuras 10 e 11), possa contribuir em alguma proporção para a manutenção da massa muscular nesse modelo, embora não tenhamos avaliado a hipótese no presente estudo.

5.3.2. Fenótipo glicolítico

Uma vez que constatamos que as alterações metabólicas musculares decorrentes da desidratação parecem ser independentes da sinalização ocitocinérgica, decidimos investigar o efeito do modelo nos músculos glicolíticos tibial anterior e EDL, que, ainda que possuam menor expressão do RNAm para OTR (Camerino et al., 2019; Costa, 2019), têm maior atividade do transportador AQP4 na membrana quando comparado ao soleus e demais músculos oxidativos (Farhat et al., 2018; Kaakinen et al., 2007) e, dessa maneira, poderiam responder de forma diferente ao estresse osmótico. Num modelo experimental *ex vivo*, observou-se que o efeito de um meio hiperosmótico em soleus e EDL foi distinto: ambos os músculos perderam conteúdo de água, mas somente a CSA das fibras tipo II no EDL foi reduzida, enquanto as fibras I permaneceram constantes em ambos os músculos. O mesmo estímulo também foi capaz de reduzir o conteúdo muscular de ATP e fosfocreatina em ambos os tipos musculares. No entanto, como os músculos foram submetidos ao estímulo fora do organismo e por apenas 60 min., não podemos discutir se essas alterações se manteriam ao prolongar o estresse osmótico (Antolic et al., 2007). Em ratos, a privação hídrica de 96 h causou, ainda, uma queda na expressão de AQP4 no músculo EDL, embora nenhuma alteração tenha sido observada na expressão desse canal em soleus (Farhat et al., 2018). Assim sendo, postulamos que nosso modelo de 36 h poderia, também, modular a expressão desse canal no EDL, interferindo na função e metabolismo muscular.

Em nosso estudo, diferente do que observamos no músculo soleus, a privação hídrica por 36 h não somente foi incapaz de reduzir a massa do músculo EDL, como a aumentou (figura 24; $p=0,013$), um achado que não se reproduziu no grupo *pair-feed*.

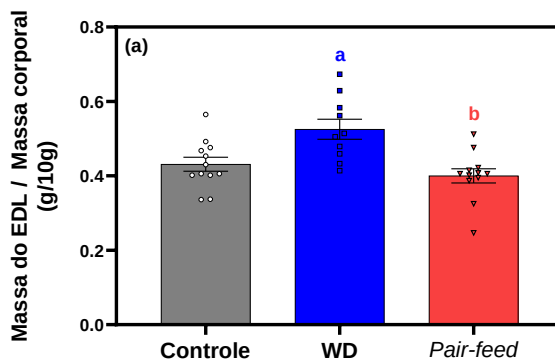


Figura 24 – Massa relativa do músculo glicolítico EDL de camundongos C57BL/6 machos submetidos à privação hídrica (36 h). Os valores estão representados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. a = $p<0,05$ vs. controle; b = $p<0,05$ vs. WD.

Além disso, quanto avaliamos por meio de imunofluorescência a área de secção transversa do músculo tibial anterior, observamos que o grupo WD apresentou um aumento na média da CSA (+19,1% vs. controle; figura 25a; $p<0,01$) decorrente do maior quantitativo de fibras de maior diâmetro (figura 25b), enquanto os animais *pair-feed* não apresentaram alteração ($p > 0,99$).

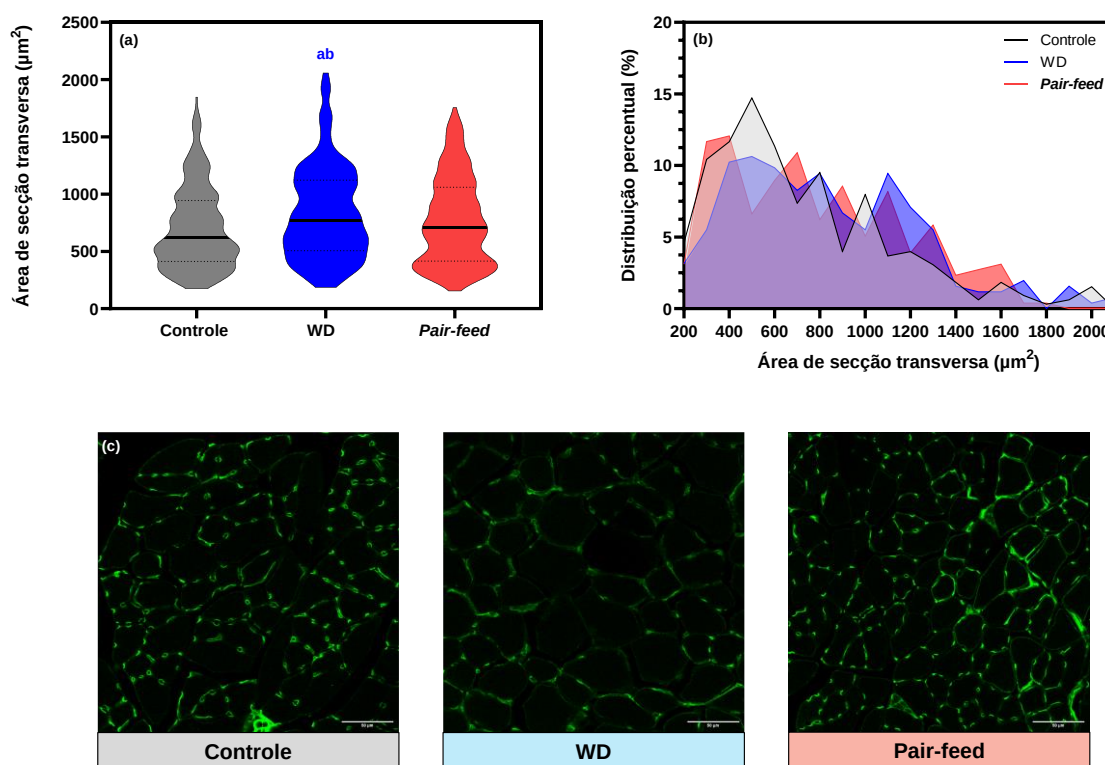


Figura 25 – Área de secção transversa do músculo tibial anterior (a) e distribuição do tamanho das fibras por frequência relativa percentual (b) em camundongos C57BL/6 machos submetidos à privação hídrica (36 h). Os valores estão representados como média $\pm$ EPM ($n = 254\text{-}326$ fibras/grupo; $n = 3$ músculos/grupo). A escala é de $50\ \mu\text{m}$, sob magnificação de $40\times$. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn. ^a = $p < 0,05$ vs. controle e ^b = $p < 0,05$ vs. *pair-feed*.

Um estudo prévio observou que a privação hídrica de 24 h em camundongos jovens (6 semanas) causou um decréscimo na expressão de AQP4 no músculo tibial anterior, que foi acompanhado da perda de massa nesse músculo (Kim et al., 2023). Embora não tenhamos aferido a massa deste músculo no presente modelo, é improvável que tenha apresentado perda, considerando o aumento na área de secção transversa. Assim, é possível que as alterações de volume celular no músculo glicolítico variem de acordo com o tempo de privação e que este músculo apresente, inicialmente, uma perda de fluidos para o ambiente extracelular, mas que recupere *a posteriori*, seja pelo transporte de fluidos, ou produção de água metabólica nas miofibras.

Considerando as análises realizadas no músculo soleus, nas quais observamos manutenção da massa acompanhada de aumento de proteólise e, portanto, sugerimos a possibilidade de retenção de fluido em decorrência do aumento

no gradiente de aminoácidos intracelular, procuramos investigar se um mecanismo similar seria responsável pelo aumento da massa relativa observada no músculo glicolítico EDL. Portanto, avaliamos sua taxa de proteólise total, mas não encontramos diferença significativa (figura 26; $p > 0,99$ vs. controle), o que sugere que neste tipo muscular o maior gradiente de aminoácidos resultante da degradação proteica não deve ter colaborado para a manutenção da massa.

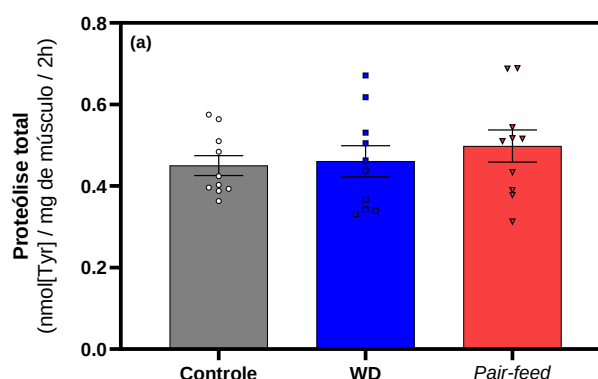


Figura 26 – Efeito da privação hídrica (36 h) na proteólise total em músculos EDL (a). Os valores estão apresentados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

Por outro lado, investigamos as possibilidades de que o aumento de massa e área de secção transversa observados nos músculos glicolíticos pudessem resultar de um mecanismo de adaptação que envolvesse um aumento na síntese proteica e/ou alteração na expressão da AQP4, que justificasse um maior influxo de água. Para tanto, utilizamo-nos de músculos EDL. Todavia, as duas hipóteses foram negativas, tendo em vista que nenhuma alteração entre grupos foi observada para ambos os parâmetros (figuras 27 e 28; $p > 0,99$).

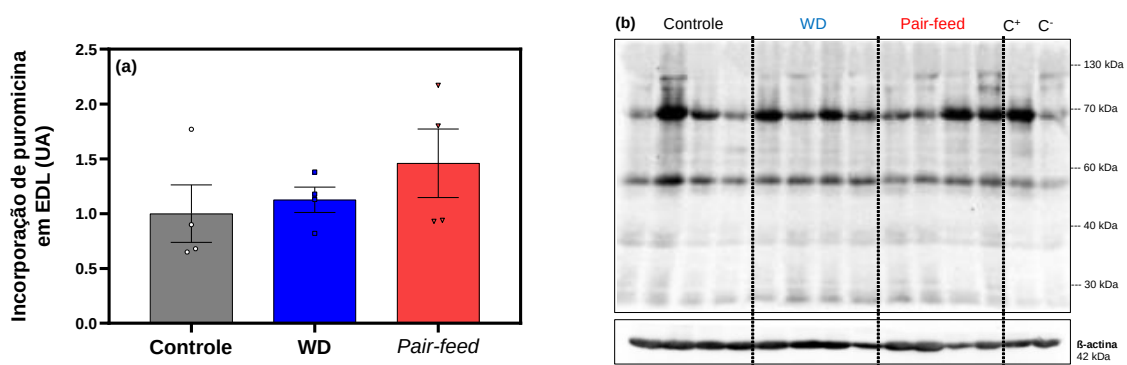


Figura 27 – Efeito da privação hídrica (36 h) na síntese proteica em músculos EDL (a). A imagem representativa do western blotting é apresentada em (b). C+ e C- indicam controle positivo e negativo, respectivamente (vide metodologia). Os valores estão apresentados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

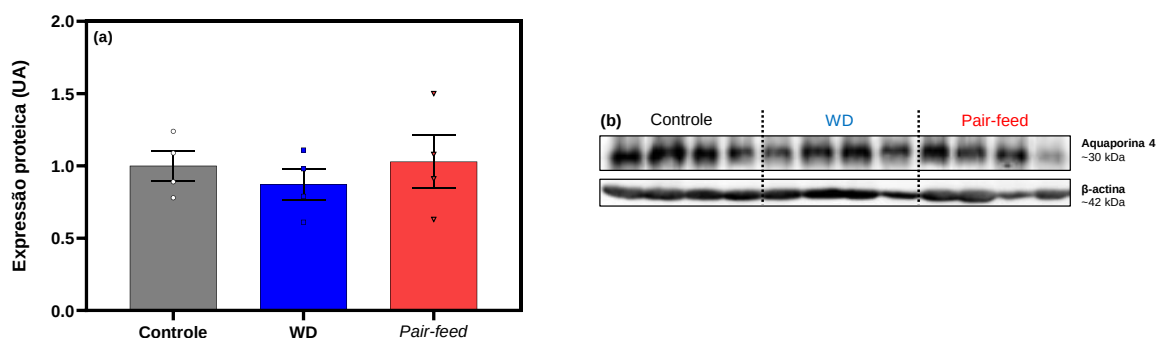


Figura 28 – Efeito da privação hídrica (36 h) na expressão do canal de água aquaporina 4 (a) em músculo EDL obtido de camundongos C57BL/6 machos. As imagens representativas do western blotting são apresentadas em (b). Os valores estão apresentados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

Diferentemente do observado nos músculos gastrocnêmio e tibial anterior de camundongos jovens submetidos à privação hídrica de 24 h (Kim et al., 2023), não vimos menor expressão de AQP4 em nosso modelo de privação, o que indica uma possível resposta individualizada de cada músculo à privação, de acordo com a tipificação de suas fibras. Ainda assim, considerando que o músculo EDL possui expressão significativa de AQP4 em sua membrana (Farhat et al., 2018), não descartamos a possibilidade de que, a despeito da ausência de alteração na expressão deste canal, o músculo apresente aumento de volume decorrente de maior influxo de água que não dependeu de um aumento na expressão deste transportador ou, ainda, que pode ter ocorrido por outro canal para água expresso na membrana sarcoplasmática.

Igualmente ao observado no músculo oxidativo soleus, a expressão do OTR em EDL não foi alterada pela privação hídrica (figura 29; $p > 0,99$), indicando uma não participação da sinalização ocitocinérgica na regulação do metabolismo muscular durante esta situação. Devido a esse achado, optamos por não avaliar a atividade da PKC.

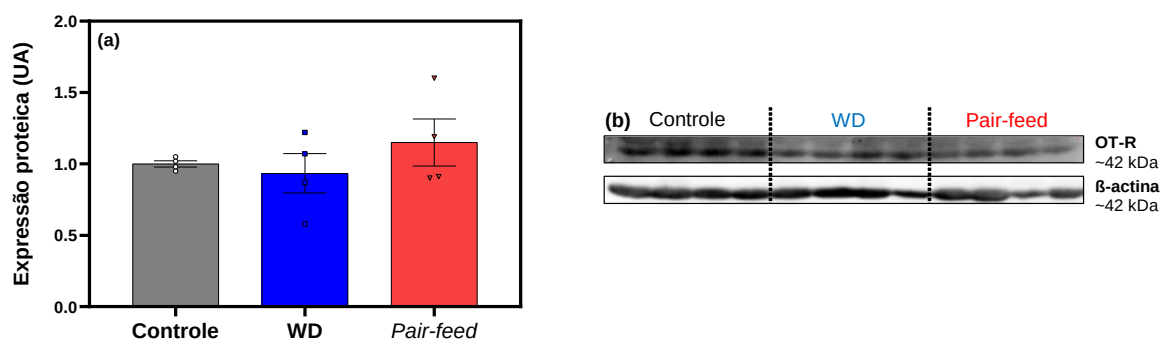


Figura 29 – Efeito da privação hídrica (36 h) na expressão do receptor para ocitocina (a) em músculo EDL obtido de camundongos C57BL/6 machos. As imagens representativas do western blotting são apresentadas em (b). Os valores estão apresentados individualmente e como média $\pm$ EPM. A normalidade foi aferida por teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos a teste de one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, exploramos os efeitos de um modelo de 36 horas de privação hídrica em camundongos, observando sua repercussão em variáveis fisiológicas e neuroendócrinas. Verificamos que o modelo foi capaz de induzir alterações de perda de massa corporal e redução na ingestão alimentar, conforme esperado, acompanhadas de hipernatremia, indicando respostas adaptativas cruciais para manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico. Todavia, observamos também que a perda de massa corporal não foi acompanhada de perda na massa dos músculos soleus, oxidativo, e EDL, glicolítico, indicando um possível mecanismo de adaptação.

Mesmo na ausência de alteração de massa, observamos que músculos soleus tiveram uma menor atividade da sinalização dependente de Akt, resultando em ativação de FoxO1 e maior atividade proteolítica total e proteassomal, que foram independentes de maior expressão de MuRF-1. De forma semelhante, não houve alteração na expressão dos marcadores de autofagia muscular.

Além disso, analisamos o metabolismo energético sistêmico, que mostrou indícios de utilização mista de carboidratos e lipídios para obtenção de energia durante a desidratação, principalmente durante o período noturno, além de depleção de glicose e hipercolesterolemia.

Embora a sinalização ocitocinérgica seja essencial em estados de desidratação para manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico, este peptídeo parece não contribuir para a manutenção da massa muscular durante a desidratação, uma vez que sua sinalização permaneceu inalterada.

Em suma, nosso trabalho destaca a complexidade das respostas adaptativas do organismo à desidratação, com modulações específicas e ocasionalmente inesperadas. As alterações no metabolismo energético sistêmico e muscular fornecem uma visão panorâmica das adaptações fisiológicas diante do desafio hídrico, de modo a fornecer uma base para que pesquisas subsequentes sejam desenvolvidas. Esses resultados não apenas contribuem para o entendimento dos mecanismos subjacentes à desidratação, mas podem fornecer implicações relevantes para áreas de desporto, endocrinologia e metabologia e estratégias de manejo de condições relacionadas à homeostase hídrica.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo se propôs a avaliar o efeito direto da desidratação na regulação do metabolismo, especialmente no que tange ao metabolismo de proteínas no ME. Também procurou investigar a possível participação da OT, cuja secreção encontra-se aumentada durante a privação de fluidos, na modulação do metabolismo no modelo proposto.

Todavia, muito há para investigar-se ainda. Assim, em vistas de ampliar nosso presente trabalho e fornecer maior panorama das alterações metabólicas decorrentes da desidratação, propomos como perspectivas futuras:

- a) Avaliação de outros parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo energético sistêmico e função muscular (e.g. triglicérides, β -hidroxi-butirato e creatina quinase).
- b) Quantificação de glicogênio no fígado e em músculos oxidativos e glicolíticos de animais submetidos à privação hídrica;
- c) Avaliação da área de secção transversa em soleus;
- d) Avaliação da via Akt/FoXO em músculos EDL;
- e) Avaliação de marcadores de metabolismo energético hepático (e.g. Akt, AMPK, GSK3, SREBP e PEPCK) e;
- f) Avaliação do efeito do tratamento farmacológico com antagonista para os receptores de ocitocina (atosiban 0,5 mg/kg, a cada 12 horas) nos parâmetros metabólicos observados, para confirmarmos a não participação deste neuropeptídeo na modulação do metabolismo energético durante a desidratação.

REFERÊNCIAS

- Adeva-Andany, M. M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., & Ameneiros-Rodríguez, E. (2016). Glycogen metabolism in humans. *BBA Clinical*, 5, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.02.001>
- Aiken, R. M. (2019). *Oxytocin and metabolic tissue: analyzing skeletal muscle and adipose tissue in neonatal oxytocin receptor knock-out mice*. Florida State University.
- Ainslie, P. N., Campbell, I. T., Frayn, K. N., Humphreys, S. M., MacLaren, D. P. M., Reilly, T., & Westerterp, K. R. (2002). Energy balance, metabolism, hydration, and performance during strenuous hill walking: the effect of age. *Journal of Applied Physiology*, 93(2), 714–723. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01249.2001>
- Alvira-Iraizoz, F., Gillard, B. T., Lin, P., Paterson, A., Pauža, A. G., Ali, M. A., Alabsi, A. H., Burger, P. A., Hamadi, N., Adem, A., Murphy, D., & Greenwood, M. P. (2021). Multiomic analysis of the Arabian camel (*Camelus dromedarius*) kidney reveals a role for cholesterol in water conservation. *Communications Biology*, 4(1), 779. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02327-3>
- Antolic, A., Harrison, R., Farlinger, C., Cermak, N. M., Peters, S. J., LeBlanc, P., & Roy, B. D. (2007). Effect of extracellular osmolality on cell volume and resting metabolism in mammalian skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292(5), R1994–R2000. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00653.2006>
- Antunes-Rodrigues, J., DE CASTRO, M., ELIAS, L. L. K., VALENÇA, M. M., & McCANN, S. M. (2004). Neuroendocrine Control of Body Fluid Metabolism. *Physiological Reviews*, 84(1), 169–208. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2003>
- Antunes-Rodrigues, J., Ruginsk, S. G., Mecawi, A. S., Margatho, L. O., Cruz, J. C., Vilhena-Franco, T., Reis, W. L., Ventura, R. R., Reis, L. C., Vivas, L. M., & Elias, L. L. K. (2013). Mapping and signaling of neural pathways involved in the regulation of hydromineral homeostasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(4), 327–338. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20132788>
- Armstrong, L. E. (2012). Challenges of linking chronic dehydration and fluid consumption to health outcomes. *Nutrition Reviews*, 70, S121–S127. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00539.x>
- Aslesh, T., Al-aghbari, A., & Yokota, T. (2023). Assessing the Role of Aquaporin 4 in Skeletal Muscle Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1489. <https://doi.org/10.3390/ijms24021489>

Baehr, L. M., Hughes, D. C., Lynch, S. A., Van Haver, D., Maia, T. M., Marshall, A. G., Radoshevich, L., Impens, F., Waddell, D. S., & Bodine, S. C. (2021). Identification of the MuRF1 Skeletal Muscle Ubiquitylome Through Quantitative Proteomics. *Function*, 2(4). <https://doi.org/10.1093/function/zqab029>

Baehr, L. M., Tunzi, M., & Bodine, S. C. (2014). Muscle hypertrophy is associated with increases in proteasome activity that is independent of MuRF1 and MAFbx expression. *Frontiers in Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00069>

Bekkevold, C. M., Robertson, K. L., Reinhard, M. K., Battles, A. H., & Rowland, N. E. (2013). Dehydration parameters and standards for laboratory mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 52(3), 233–239.

Benedetti, M., Rorato, R., Castro, M., Machado, B. H., Antunes-Rodrigues, J., & Elias, L. L. K. (2008). Water deprivation increases Fos expression in hypothalamic corticotropin-releasing factor neurons induced by right atrial distension in awake rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(5), R1706–R1712. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00022.2008>

Bennet, D., Khorsandian, Y., Pelusi, J., Mirabella, A., Pirrotte, P., & Zenhausern, F. (2021). Molecular and physical technologies for monitoring fluid and electrolyte imbalance: A focus on cancer population. *Clinical and Translational Medicine*, 11(6). <https://doi.org/10.1002/ctm2.461>

Benton, D., Jenkins, K. T., Watkins, H. T., & Young, H. A. (2016). Minor degree of hypohydration adversely influences cognition: a mediator analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 104(3), 603–612. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.132605>

Bergström, J., Fürst, P., Norée, L. O., & Vinnars, E. (1974). Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *Journal of Applied Physiology*, 36(6), 693–697. <https://doi.org/10.1152/jappl.1974.36.6.693>

Bernal, A., Zafra, M. A., Simón, M. J., & Mahía, J. (2023). Sodium Homeostasis, a Balance Necessary for Life. *Nutrients*, 15(2), 395. <https://doi.org/10.3390/nu15020395>

Blevins, J. E., Graham, J. L., Morton, G. J., Bales, K. L., Schwartz, M. W., Baskin, D. G., & Havel, P. J. (2015). Chronic oxytocin administration inhibits food intake, increases energy expenditure, and produces weight loss in fructose-fed obese rhesus monkeys. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308(5), R431–R438. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00441.2014>

Bodine, S. C. (2001). Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Science*, 294(5547), 1704–1708. <https://doi.org/10.1126/science.1065874>

Boerth, R. C., COVELL, J. W., POOL, P. E., & ROSS, J. (1969). Increased Myocardial Oxygen Consumption and Contractile State Associated with Increased Heart Rate in Dogs. *Circulation Research*, 24(5), 725–734. <https://doi.org/10.1161/01.RES.24.5.725>

Bolster, D. R., Jefferson, L. S., & Kimball, S. R. (2004). Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63(2), 351–356. <https://doi.org/10.1079/PNS2004355>

Boschmann, M., Steiniger, J., Hille, U., Tank, J., Adams, F., Sharma, A. M., Klaus, S., Luft, F. C., & Jordan, J. (2003). Water-Induced Thermogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(12), 6015–6019. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030780>

Brennan, M., O’Keeffe, S. T., & Mulkerrin, E. C. (2019). Dehydration and renal failure in older persons during heatwaves-predictable, hard to identify but preventable? *Age and Ageing*, 48(5), 615–618. <https://doi.org/10.1093/ageing/afz080>

Breton, C., Haenggeli, C., Barberis, C., Heitz, F., Bader, C. R., Bernheim, L., & Tribollet, E. (2002). Presence of functional oxytocin receptors in cultured human myoblasts. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(3), 1415–1418. <https://doi.org/10.1210/JCEM.87.3.8537>

Brownstein, A. J., Ganesan, S., Summers, C. M., Pearce, S., Hale, B. J., Ross, J. W., Gabler, N., Seibert, J. T., Rhoads, R. P., Baumgard, L. H., & Selsby, J. T. (2017). Heat stress causes dysfunctional autophagy in oxidative skeletal muscle. *Physiological Reports*, 5(12). <https://doi.org/10.14814/phy2.13317>

Burge, M. R., Garcia, N., Qualls, C. R., & Schade, D. S. (2001). Differential effects of fasting and dehydration in the pathogenesis of diabetic ketoacidosis. *Metabolism*, 50(2), 171–177. <https://doi.org/10.1053/meta.2001.20194>

Camerino, C. (2020). The New Frontier in Oxytocin Physiology: The Oxytonic Contraction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 5144. <https://doi.org/10.3390/ijms21145144>

Camerino, C., Conte, E., Carratù, M. R., Fonzino, A., Lograno, M. D., & Tricarico, D. (2019). Oxytocin/Osteocalcin/IL-6 and NGF/BDNF mRNA Levels in Response to Cold Stress Challenge in Mice: Possible Oxytonic Brain-Bone-Muscle-Interaction. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01437>

Campa, F., Piras, A., Raffi, M., Trofè, A., Perazzolo, M., Mascherini, G., & Toselli, S. (2020). The Effects of Dehydration on Metabolic and Neuromuscular Functionality during Cycling. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), 1161. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041161>

- Campbell, N., Brant, R., Stalts, H., Stone, J., & Mahallati, H. (1998). Fluctuations in Blood Lipid Levels During Furosemide Therapy. *Archives of Internal Medicine*, 158(13), 1461. <https://doi.org/10.1001/archinte.158.13.1461>
- Campbell, N. R., Wickert, W., Magner, P., & Shumak, S. L. (1994). Dehydration during fasting increases serum lipids and lipoproteins. *Clinical and Investigative Medicine. Medecine Clinique et Experimentale*, 17(6), 570–576.
- Cervone, D. T., Moreno-Justicia, R., Quesada, J. P., & Deshmukh, A. S. (2023). Mass spectrometry-based proteomics approaches to interrogate skeletal muscle adaptations to exercise. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. <https://doi.org/10.1111/sms.14334>
- Chang, D. C., Basolo, A., Piaggi, P., Votruba, S. B., & Krakoff, J. (2020). Hydration biomarkers and copeptin: relationship with ad libitum energy intake, energy expenditure, and metabolic fuel selection. *European Journal of Clinical Nutrition*, 74(1), 158–166. <https://doi.org/10.1038/s41430-019-0445-6>
- Chapman, C. L., Johnson, B. D., Vargas, N. T., Hostler, D., Parker, M. D., & Schlader, Z. J. (2020). Both hyperthermia and dehydration during physical work in the heat contribute to the risk of acute kidney injury. *Journal of Applied Physiology*, 128(4), 715–728. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00787.2019>
- Christoph Kuper, Franz-X. Beck, & Wolfgang Neuhofer. (2007). Osmoadaptation of Mammalian Cells - An Orchestrated Network of Protective Genes. *Current Genomics*, 8(4), 209–218. <https://doi.org/10.2174/138920207781386979>
- Chung, S. W., Kim, J.-Y., Yoon, J. P., Suh, D. W., Yeo, W. J., & Lee, Y.-S. (2020). Atrogin1-induced loss of aquaporin 4 in myocytes leads to skeletal muscle atrophy. *Scientific Reports*, 10(1), 14189. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71167-8>
- Cleary, M. A., Sitler, M. R., & Kendrick, Z. V. (2006). Dehydration and symptoms of delayed-onset muscle soreness in normothermic men. *Journal of Athletic Training*, 41(1), 36–45.
- Coletti, R., Almeida-Pereira, G., Elias, L. L. K., & Antunes-Rodrigues, J. (2015). Effects of hydrogen sulfide (H₂S) on water intake and vasopressin and oxytocin secretion induced by fluid deprivation. *Hormones and Behavior*, 67, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.11.008>
- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. (2023). *Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica*.
- Costa, D. M. (2019). *Efeitos anabólicos e anti-catabólicos da ocitocina no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratas* [Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas)]. Universidade Federal de Sergipe.

Costa, D. M., Cruz-Filho, J. D., Vasconcelos, A. B. S., Gomes-Santos, J. V., Reis, L. C., de Lucca, W., Camargo, E. A., Lauton-Santos, S., Zanon, N. M., Kettelhut, Í. D. C., Navegantes, L. C., Mecawi, A. D. S., Badauê-Passos, D., & Lustrino, D. (2021). Oxytocin induces anti-catabolic and anabolic effects on protein metabolism in the female rat oxidative skeletal muscle. *Life Sciences*, 279. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119665>

Cui, F., Liu, H., Zou, Z., & Li, H. (2015). Metabolic responses to water deprivation in C57BL/6J mice using a proton nuclear magnetic resonance-based metabolomics approach. *RSC Advances*, 5(98). <https://doi.org/10.1039/C5RA12650A>

Dai, D., Li, Q.-C., Zhu, Q.-B., Hu, S.-H., Balesar, R., Swaab, D., & Bao, A.-M. (2017). Direct Involvement of Androgen Receptor in Oxytocin Gene Expression: Possible Relevance for Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*, 42(10), 2064–2071. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.76>

Damas, F., Phillips, S. M., Lixandrão, M. E., Vechin, F. C., Libardi, C. A., Roschel, H., Tricoli, V., & Ugrinowitsch, C. (2016). Early resistance training-induced increases in muscle cross-sectional area are concomitant with edema-induced muscle swelling. *European Journal of Applied Physiology*, 116(1), 49–56. <https://doi.org/10.1007/s00421-015-3243-4>

De Jager, N., Hudson, N., Reverter, A., Wang, Y.-H., Nagaraj, S., Cafe, L., Greenwood, P., Barnard, R., Kongsuwan, K., & Dalrymple, B. (2011). Chronic exposure to anabolic steroids induces the muscle expression of oxytocin and a more than fiftyfold increase in circulating oxytocin in cattle. *Physiological Genomics*, 43, 467–478. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00226.2010>

Dheen, S. T., Tay, S. S. W., & Wong, W. C. (1994). Arginine Vasopressin- and Oxytocin-like Immunoreactive Neurons in the Hypothalamic Paraventricular and Supraoptic Nuclei of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Archives of Histology and Cytology*, 57(5), 461–472. <https://doi.org/10.1679/aohc.57.461>

Duan, Y., Fu, W., Wang, S., Ni, Y., & Zhao, R. (2014). Cholesterol deregulation induced by chronic corticosterone (CORT) stress in pectoralis major of broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 176, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.07.010>

Edmonds, C. J., Foglia, E., Booth, P., Fu, C. H. Y., & Gardner, M. (2021). Dehydration in older people: A systematic review of the effects of dehydration on health outcomes, healthcare costs and cognitive performance. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 95, 104380. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2021.104380>

Edström, E., Altun, M., Bergman, E., Johnson, H., Kullberg, S., Ramírez-León, V., & Ulfhake, B. (2007). Factors contributing to neuromuscular impairment and sarcopenia during aging. *Physiology & Behavior*, 92(1–2), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.040>

EFSA Panel on Dietetic Products, N. and A. (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for water. *EFSA Journal*, 8(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1459>

Elabd, C., Cousin, W., Upadhyayula, P., Chen, R. Y., Chooljian, M. S., Li, J., Kung, S., Jiang, K. P., & Conboy, I. M. (2014). Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. *Nature Communications*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms5082>

Elfers, K., Armbrecht, Y., Brede, M., Mazzuoli-Weber, G., Heldmaier, G., & Breves, G. (2022). How much does it cost? Teaching physiology of energy metabolism in mice using an indirect calorimetry system in a practical course for veterinary students. *Advances in Physiology Education*, 46(1), 145–157. <https://doi.org/10.1152/advan.00027.2021>

El-Sharkawy, A. M., Devonald, M. A. J., Humes, D. J., Sahota, O., & Lobo, D. N. (2020). Hyperosmolar dehydration: A predictor of kidney injury and outcome in hospitalised older adults. *Clinical Nutrition*, 39(8), 2593–2599. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.11.030>

El-Sharkawy, A. M., Sahota, O., & Lobo, D. N. (2015). Acute and chronic effects of hydration status on health. *Nutrition Reviews*, 73(suppl 2), 97–109. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv038>

Ememe, M. U., & Edeh, R. E. (2022). A Case of Exertional Rhabdomyolysis in an 11-year-old Argentine Mare . *Sahel Journal of Veterinary Sciences*, 19(4), 20–23. <https://doi.org/10.54058/saheljvs.v19i4.313>

Engell, D. (1988). Interdependency of food and water intake in humans. *Appetite*, 10(2), 133–141. [https://doi.org/10.1016/0195-6663\(88\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0195-6663(88)90064-5)

Eskelinen, E.-L., & Saftig, P. (2009). Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(4), 664–673. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.07.014>

Farhat, F., Grosset, J. F., & Canon, F. (2018). Water deprivation decreases strength in fast twitch muscle in contrast to slow twitch muscle in rat. *Acta Physiologica*, 224(1), e13072. <https://doi.org/10.1111/apha.13072>

Felintro, V., Trujillo, V., dos-Santos, R. C., da Silva-Almeida, C., Reis, L. C., Rocha, F. F., & Mecawi, A. S. (2023). Water deprivation induces hypoactivity in rats independently of oxytocin receptor signaling at the central amygdala. *Frontiers in Endocrinology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2023.1062211>

Fernández-Elías, V. E., Ortega, J. F., Nelson, R. K., & Mora-Rodriguez, R. (2015). Relationship between muscle water and glycogen recovery after prolonged exercise in the heat in humans. *European Journal of Applied Physiology*, 115(9), 1919–1926. <https://doi.org/10.1007/s00421-015-3175-z>

Florian, M., Jankowski, M., & Gutkowska, J. (2010). Oxytocin Increases Glucose Uptake in Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Endocrinology*, 151(2), 482–491. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0624>

Franchi-Gazzola, R., Visigalli, R., Bussolati, O., Dall'Asta, V., & Gazzola, G. C. (1999). Adaptive Increase of Amino Acid Transport System A Requires ERK1/2 Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(41), 28922–28928. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.28922>

Frith, J. (2023). New horizons in the diagnosis and management of dehydration. *Age and Ageing*, 52(10). <https://doi.org/10.1093/ageing/afad193>

Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcified Tissue International*, 96(3), 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>

Gasmi, A., Peana, M., Arshad, M., Butnariu, M., Menzel, A., & Bjørklund, G. (2021). Krebs cycle: activators, inhibitors and their roles in the modulation of carcinogenesis. *Archives of Toxicology*, 95(4), 1161–1178. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-02974-9>

Gerich, J., Penhos, J. C., Gutman, R. A., & Recant, L. (1973). Effect of Dehydration and Hyperosmolarity on Glucose, Free Fatty Acid and Ketone Body Metabolism in the Rat. *Diabetes*, 22(4), 264–271. <https://doi.org/10.2337/diab.22.4.264>

Gerson, A. R., & Guglielmo, C. G. (2011). Flight at Low Ambient Humidity Increases Protein Catabolism in Migratory Birds. *Science*, 333(6048), 1434–1436. <https://doi.org/10.1126/science.1210449>

Gimpl, G., & Fahrenholz, F. (2001). The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. *Physiological Reviews*, 81(2), 629–683. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.629>

Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>

Glickman, M. H., & Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews*, 82(2), 373–428. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2001>

González-Alonso, J., Calbet, J. A. L., & Nielsen, B. (1999). Metabolic and thermodynamic responses to dehydration-induced reductions in muscle blood flow in exercising humans. *The Journal of Physiology*, 520(2), 577–589. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.00577.x>

Gopinathan, P. M., Pichan, G., & Sharma, V. M. (1988). Role of Dehydration in Heat Stress-Induced Variations in Mental Performance. *Archives of*

Environmental Health: An International Journal, 43(1), 15–17. <https://doi.org/10.1080/00039896.1988.9934367>

Hackney, K. J., Cook, S. B., Fairchild, T. J., & Ploutz-Snyder, L. L. (2012). Skeletal muscle volume following dehydration induced by exercise in heat. *Extreme Physiology & Medicine*, 1(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2046-7648-1-3>

Haussinger, D. (1993). Cellular hydration state: an important determinant of protein catabolism in health and disease. *The Lancet*, 341(8856), 1330–1332. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90828-5](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90828-5)

Haussinger, D., Lang, F., & Gerok, W. (1994). Regulation of cell function by the cellular hydration state. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 267(3), E343–E355. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1994.267.3.E343>

Irahara, T., Sato, N., Otake, K., Matsumura, S., Inoue, K., Ishihara, K., Fushiki, T., & Yokota, H. (2018). Alterations in energy substrate metabolism in mice with different degrees of sepsis. *Journal of Surgical Research*, 227, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.01.021>

Isik, O., Yildirim, I., Ersoz, Y., Koca, H. B., Dogan, I., & Ulutas, E. (2018). Monitoring of pre-competition dehydration- induced skeletal muscle damage and inflammation levels among elite wrestlers. *Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation*, 31(3), 533–540. <https://doi.org/10.3233/BMR-170955>

Jaiswal, N., Gavin, M., Loro, E., Sostre-Colón, J., Roberson, P. A., Uehara, K., Rivera-Fuentes, N., Neinast, M., Arany, Z., Kimball, S. R., Khurana, T. S., & Titchenell, P. M. (2022). AKT controls protein synthesis and oxidative metabolism via combined mTORC1 and FOXO1 signalling to govern muscle physiology. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 13(1), 495–514. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12846>

Jenni-Eiermann, S., & Jenni, L. (2000). Fuel supply and metabolic constraints in migrating birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 126, S52. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)80104-2](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)80104-2)

Jéquier, E., & Constant, F. (2010). Water as an essential nutrient: the physiological basis of hydration. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(2), 115–123. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.111>

Judelson, D. A., Maresh, C. M., Anderson, J. M., Armstrong, L. E., Casa, D. J., Kraemer, W. J., & Volek, J. S. (2007). Hydration and Muscular Performance. *Sports Medicine*, 37(10), 907–921. <https://doi.org/10.2165/00007256-200737100-00006>

Kaakinen, M., Salmela, P., Zelenin, S., & Metsikkö, K. (2007). Distribution of aquaporin 4 on sarcolemma of fast-twitch skeletal myofibres. *Cell and Tissue Research*, 329(3), 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0442-2>

- Keller, U., Szinnai, G., Bilz, S., & Berneis, K. (2003). Effects of changes in hydration on protein, glucose and lipid metabolism in man: impact on health. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57 Suppl 2(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1038/SJ.EJCN.1601904>
- Kim, C.-S., Chun, W. Y., & Shin, D.-M. (2020). Dehydration Impairs Physical Growth and Cognitive Development in Young Mice. *Nutrients*, 12(3), 670. <https://doi.org/10.3390/nu12030670>
- Kim, P. Y., Zhong, M., Kim, Y.-S., Sanborn, B. M., & Allen, K. G. D. (2012). Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids Alter Oxytocin Signaling and Receptor Density in Cultured Pregnant Human Myometrial Smooth Muscle Cells. *PLoS ONE*, 7(7), e41708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041708>
- Kim, S.-J., Baek, K.-W., Jung, Y.-K., Kim, J.-S., Kim, B.-G., Yu, H. S., Park, J. S., & Yoo, J.-I. (2023). Changes in aquaporins expression due to acute water restriction in naturally aging mice. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 79(1), 71–81. <https://doi.org/10.1007/s13105-022-00921-5>
- Kitada, K., Daub, S., Zhang, Y., Klein, J. D., Nakano, D., Pedchenko, T., Lantier, L., LaRocque, L. M., Marton, A., Neubert, P., Schröder, A., Rakova, N., Jantsch, J., Dikalova, A. E., Dikalov, S. I., Harrison, D. G., Müller, D. N., Nishiyama, A., Rauh, M., ... Titze, J. (2017). High salt intake reprioritizes osmolyte and energy metabolism for body fluid conservation. *Journal of Clinical Investigation*, 127(5), 1944–1959. <https://doi.org/10.1172/JCI88532>
- Koehler-Stec, E. M., Li, K., Maher, F., Vannucci, S. J., Smith, C. B., & Simpson, I. A. (2000). Cerebral Glucose Utilization and Glucose Transporter Expression: Response to Water Deprivation and Restoration. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20(1), 192–200. <https://doi.org/10.1097/00004647-200001000-00024>
- Kongsuwan, K., Knox, M. R., Allingham, P. G., Pearson, R., & Dalrymple, B. P. (2012). The effect of combination treatment with trenbolone acetate and estradiol-17 β on skeletal muscle expression and plasma concentrations of oxytocin in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, 43(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2012.02.004>
- Kothari, V., Luo, Y., Tornabene, T., O'Neill, A. M., Greene, M. W., Geetha, T., & Babu, J. R. (2017). High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(2), 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.10.006>
- Kovarik, J. J., Morisawa, N., Wild, J., Marton, A., Takase-Minegishi, K., Minegishi, S., Daub, S., Sands, J. M., Klein, J. D., Bailey, J. L., Kovalik, J. P., Rauh, M., Karbach, S., Hilgers, K. F., Luft, F., Nishiyama, A., Nakano, D., Kitada, K., & Titze, J. (2021). Adaptive physiological water conservation explains hypertension and muscle catabolism in experimental chronic renal failure. *Acta Physiologica*, 232(1). <https://doi.org/10.1111/apha.13629>

- Krawiec, B. J., Nystrom, G. J., Frost, R. A., Jefferson, L. S., & Lang, C. H. (2007). AMP-activated protein kinase agonists increase mRNA content of the muscle-specific ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1 in C₂C₁₂ cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(6), E1555–E1567. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00622.2006>
- Lacey, J., Corbett, J., Forni, L., Hooper, L., Hughes, F., Minto, G., Moss, C., Price, S., Whyte, G., Woodcock, T., Mythen, M., & Montgomery, H. (2019). A multidisciplinary consensus on dehydration: definitions, diagnostic methods and clinical implications. *Annals of Medicine*, 51(3–4), 232–251. <https://doi.org/10.1080/07853890.2019.1628352>
- Lara Aparicio, S. Y., Laureani Fierro, Á. de J., Aranda Abreu, G. E., Toledo Cárdenas, R., García Hernández, L. I., Coria Ávila, G. A., Rojas Durán, F., Aguilar, M. E. H., Manzo Denes, J., Chi-Castañeda, L. D., & Pérez Estudillo, C. A. (2022). Current Opinion on the Use of c-Fos in Neuroscience. *NeuroSci*, 3(4), 687–702. <https://doi.org/10.3390/neurosci3040050>
- Lecker, S. H., Goldberg, A. L., & Mitch, W. E. (2006). Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(7), 1807–1819. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010083>
- Leduc-Gaudet, J.-P., Miguez, K., Cefis, M., Faitg, J., Moamer, A., Chaffer, T. J., Reynaud, O., Broering, F. E., Shams, A., Mayaki, D., Huck, L., Sandri, M., Gousspillou, G., & Hussain, S. N. A. (2023). Autophagy ablation in skeletal muscles worsens sepsis-induced muscle wasting, impairs whole-body metabolism, and decreases survival. *IScience*, 26(8), 107475. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107475>
- Lee, E. S., Uhm, K.-O., Lee, Y. M., Kwon, J., Park, S.-H., & Soo, K. H. (2008). Oxytocin stimulates glucose uptake in skeletal muscle cells through the calcium–CaMKK–AMPK pathway. *Regulatory Peptides*, 151(1–3), 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2008.05.001>
- Leng, G., & Russell, J. A. (2019). The osmoresponsiveness of oxytocin and vasopressin neurones: Mechanisms, allostasis and evolution. *Journal of Neuroendocrinology*, 31(3), e12662. <https://doi.org/10.1111/JNE.12662>
- Lewis, Z. R. (2018). *The Effect of Dehydration on Metabolism and Energy Substrate Utilization*. University of Arkansas.
- Liu, C. M., Spaulding, M. O., Rea, J. J., Noble, E. E., & Kanoski, S. E. (2021). Oxytocin and Food Intake Control: Neural, Behavioral, and Signaling Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10859. <https://doi.org/10.3390/ijms221910859>
- Logan-Sprenger, H. M., Heigenhauser, G. J. F., Jones, G. L., & Spriet, L. L. (2013). Increase in Skeletal-Muscle Glycogenolysis and Perceived Exertion With Progressive Dehydration During Cycling in Hydrated Men. *International Journal*

of Sport Nutrition and Exercise Metabolism, 23(3), 220–229. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.23.3.220>

Lorenzo, I., Serra-Prat, M., & Yébenes, J. C. (2019). The Role of Water Homeostasis in Muscle Function and Frailty: A Review. *Nutrients* 2019, Vol. 11, Page 1857, 11(8), 1857. <https://doi.org/10.3390/NU11081857>

Luo, Y., Kaur, C., & Ling, E.-A. (2002). Neuronal and glial response in the rat hypothalamus–neurohypophysis complex with streptozotocin-induced diabetes. *Brain Research*, 925(1), 42–54. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03258-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03258-9)

Luu, B. E., Zhang, Y., & Storey, K. B. (2020). The regulation of Akt and FoxO transcription factors during dehydration in the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Cell Stress and Chaperones*, 25(6), 887–897. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01123-y>

Machado, J., Manfredi, L. H., Silveira, W. A., Gonçalves, D. A. P., Lustrino, D., Zanon, N. M., Kettelhut, I. C., & Navegantes, L. C. (2016). Calcitonin gene-related peptide inhibits autophagic-lysosomal proteolysis through cAMP/PKA signaling in rat skeletal muscles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 72, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.12.011>

Maejima, Y., Rita, R. S., Santoso, P., Aoyama, M., Hiraoka, Y., Nishimori, K., Gantulga, D., Shimomura, K., & Yada, T. (2015). Nasal Oxytocin Administration Reduces Food Intake without Affecting Locomotor Activity and Glycemia with c-Fos Induction in Limited Brain Areas. *Neuroendocrinology*, 101(1), 35–44. <https://doi.org/10.1159/000371636>

Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169(3), 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>

Masset, M. P., Johnson, D. G., & Kregel, K. C. (1996). Cardiovascular and sympathoadrenal responses to heat stress following water deprivation in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 270(3), R652–R659. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.270.3.R652>

McCue, M. D., Sandoval, J., Beltran, J., & Gerson, A. R. (2017). Dehydration Causes Increased Reliance on Protein Oxidation in Mice: A Test of the Protein-for-Water Hypothesis in a Mammal. *https://Doi.Org/10.1086/690912*, 90(3), 359–369. <https://doi.org/10.1086/690912>

Mecawi, A. de S., Ruginsk, S. G., Elias, L. L. K., Varanda, W. A., & Antunes-Rodrigues, J. (2015). Neuroendocrine Regulation of Hydromineral Homeostasis. *Comprehensive Physiology*, 5(3), 1465–1516. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C140031>

Min, H. K., Ko, H. Y., Kim, J. T., Bankir, L., & Lee, S. W. (2020). Low hydration status may be associated with insulin resistance and fat distribution: analysis of the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2008–

2010. *British Journal of Nutrition*, 124(2), 199–208.
<https://doi.org/10.1017/S0007114520001063>

Mora-Rodríguez, R., Fernández-Elías, V. E., Hamouti, N., & Ortega, J. F. (2015). Skeletal muscle water and electrolytes following prolonged dehydrating exercise. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 25(3).
<https://doi.org/10.1111/sms.12316>

Moresi, V., Garcia-Alvarez, G., Pristerà, A., Rizzuto, E., Albertini, M. C., Rocchi, M., Marazzi, G., Sassoon, D., Adamo, S., & Coletti, D. (2009). Modulation of Caspase Activity Regulates Skeletal Muscle Regeneration and Function in Response to Vasopressin and Tumor Necrosis Factor. *PLoS ONE*, 4(5), e5570.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005570>

Morton, G. J., Thatcher, B. S., Reidelberger, R. D., Ogimoto, K., Wolden-Hanson, T., Baskin, D. G., Schwartz, M. W., & Blevins, J. E. (2012). Peripheral oxytocin suppresses food intake and causes weight loss in diet-induced obese rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 302(1), E134–E144. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00296.2011>

Muñoz, C. X., Johnson, E. C., DeMartini, J. K., Huggins, R. A., McKenzie, A. L., Casa, D. J., Maresh, C. M., & Armstrong, L. E. (2013). Assessment of hydration biomarkers including salivary osmolality during passive and active dehydration. *European Journal of Clinical Nutrition*, 67(12), 1257–1263.
<https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.195>

Narvaez-Sanchez, R., Calderón, J. C., Vega, G., Trillos, M. C., & Ospina, S. (2019). Skeletal muscle as a protagonist in the pregnancy metabolic syndrome. *Medical Hypotheses*, 126, 26–37. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2019.02.049>

Neumann, I., Russell, J. A., & Landgraf, R. (1993). Oxytocin and vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of pregnant, parturient and lactating rats: A microdialysis study. *Neuroscience*, 53(1), 65–75.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90285-N](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90285-N)

Newsome, W. P., Warskulat, U., Noe, B., Wettstein, M., Stoll, B., Gerok, W., & Häussinger, D. (1994). Modulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA levels by the hepatocellular hydration state. *Biochemical Journal*, 304(2), 555–560. <https://doi.org/10.1042/bj3040555>

Nicchia, G. P., Pisani, F., Sparaneo, A., Mola, M. G., Basco, D., Rossi, A., Svelto, M., & Frigeri, A. (2013). Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles from a physiological and pathophysiological point of view. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 2(4), 143–154.
<https://doi.org/10.1002/wmts.86>

Nose, H., Morimoto, T., & Ogura, K. (1983). Distribution of Water Losses among Fluid Compartments of Tissues under Thermal Dehydration in the Rat. *The Japanese Journal of Physiology*, 33(6), 1019–1029.
<https://doi.org/10.2170/JJPHYSIOL.33.1019>

- Okediran, B. S., Amid, S. A., Sanusi, F., & Oladesu, K. O. (2021). Haematological and biochemical changes associated with male rats deprived of feed and water. *Ceylon Journal of Science*, 50(1), 11. <https://doi.org/10.4038/cjs.v50i1.7842>
- Ozkan, I., & Ibrahim, C. H. (2016). Dehydration, skeletal muscle damage and inflammation before the competitions among the elite wrestlers. *Journal of Physical Therapy Science*, 28(1), 162–168. <https://doi.org/10.1589/jpts.28.162>
- Ozougwu, J. C. (2017). Physiology of the liver. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, 4(8), 13–24.
- Parise, G., Murrant, C. L., Cocks, M., Snijders, T., Baum, O., & Plyley, M. J. (2020). Capillary facilitation of skeletal muscle function in health and disease. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 45(5), 453–462. <https://doi.org/10.1139/apnm-2019-0416>
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
- Périard, J. D., Eijssvogels, T. M. H., & Daanen, H. A. M. (2021). Exercise under heat stress: thermoregulation, hydration, performance implications, and mitigation strategies. *Physiological Reviews*, 101(4), 1873–1979. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2020>
- Périard, J., Tammam, A., & Thompson, M. (2012). Skeletal Muscle Strength and Endurance are Maintained during Moderate Dehydration. *International Journal of Sports Medicine*, 33(08), 607–612. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1306327>
- Perry, R. J., Rabin-Court, A., Song, J. D., Cardone, R. L., Wang, Y., Kibbey, R. G., & Shulman, G. I. (2019). Dehydration and insulinopenia are necessary and sufficient for euglycemic ketoacidosis in SGLT2 inhibitor-treated rats. *Nature Communications*, 10(1), 548. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08466-w>
- Popkin, B. M., D'Anci, K. E., & Rosenberg, I. H. (2010). Water, hydration, and health. *Nutrition Reviews*, 68(8), 439–458. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00304.x>
- Price, E. R., & Mager, E. M. (2020). Respiratory quotient: Effects of fatty acid composition. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 333(9), 613–618. <https://doi.org/10.1002/jez.2422>
- Qin, X., Jiang, B., & Zhang, Y. (2016). 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle*, 15(6), 781–786. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1151581>
- Quirós Cognuck, S., Reis, W. L., Silva, M. S., Almeida-Pereira, G., Debarba, L. K., Zorro, S. V., Mecawi, A. S., Franci, C. R., Elias, L. L. K., & Antunes-Rodrigues, J. (2020). Sex- and age-dependent differences in the hormone and drinking responses to water deprivation. *American Journal of Physiology-Regulatory*,

Integrative and Comparative Physiology, 318(3), R567–R578.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00303.2019>

Ruginsk, S. G., Vechiato, F. M. V., Uchoa, E. T., Elias, L. L. K., & Antunes-Rodrigues, J. (2015). Type 1 cannabinoid receptor modulates water deprivation-induced homeostatic responses. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 309(11), R1358–R1368.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00536.2014>

Santos, T. de O., Cruz-Filho, J. da, Costa, D. M., Silva, R. P. da, Anjos-Santos, H. C. dos, Santos, J. R. dos, Reis, L. C., Kettelhut, Í. do C., Navegantes, L. C., Camargo, E. A., Lauton-Santos, S., Badauê-Passos Jr, D., Mecawi, A. de S., & Lustrino, D. (2023). Non-canonical Ca²⁺- Akt signaling pathway mediates the antiproteolytic effects induced by oxytocin receptor stimulation in skeletal muscle. *Biochemical Pharmacology*, 217, 115850.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115850>

Savoie, F.-A., Kenefick, R. W., Ely, B. R., Cheuvront, S. N., & Goulet, E. D. B. (2015). Effect of Hypohydration on Muscle Endurance, Strength, Anaerobic Power and Capacity and Vertical Jumping Ability: A Meta-Analysis. *Sports Medicine*, 45(8), 1207–1227. <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0349-0>

Schachter, T. N., Shen, T., Liu, Y., & Schneider, M. F. (2012). Kinetics of nuclear-cytoplasmic translocation of Foxo1 and Foxo3A in adult skeletal muscle fibers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(9), C977–C990.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00027.2012>

Schakman, O., Kalista, S., Barbé, C., Loumaye, A., & Thissen, J. P. (2013). Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(10), 2163–2172.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.036>

Schiaffino, S., & Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal Muscle*, 1(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-4>

Schliess, F., Richter, L., Vom Dahl, S., & Häussinger, D. (2006). Cell hydration and mTOR-dependent signalling. *Acta Physiologica*, 187(1–2), 223–229.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2006.01547.x>

Schwartz, M. W., & Seeley, R. J. (1997). Neuroendocrine Responses to Starvation and Weight Loss. *New England Journal of Medicine*, 336(25), 1802–1811. <https://doi.org/10.1056/NEJM199706193362507>

Scicchitano, B. M., Dobrowolny, G., Sica, G., & Musaro, A. (2018). Molecular Insights into Muscle Homeostasis, Atrophy and Wasting. *Current Genomics*, 19(5), 356–369. <https://doi.org/10.2174/1389202919666180101153911>

Seal, A. D., Suh, H.-G., Jansen, L. T., Summers, L. G., & Kavouras, S. A. (2019). Hydration and Health. In *Analysis in Nutrition Research* (pp. 299–319). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814556-2.00011-7>

Secor, S. M. (2016). Integrative Physiology of Fasting. In *Comprehensive Physiology* (pp. 773–825). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150013>

Shaheen, N. A., Alqahtani, A. A., Assiri, H., Alkhodair, R., & Hussein, M. A. (2018). Public knowledge of dehydration and fluid intake practices: variation by participants' characteristics. *BMC Public Health*, 18(1), 1346. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-6252-5>

Steppel, J. H., & Horton, E. S. (2003). Exercise in the management of type 1 diabetes mellitus. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 4(4), 355–360. <https://doi.org/10.1023/A:1027302112655>

Sun, M., & Zhang, X. (2022). Current methodologies in protein ubiquitination characterization: from ubiquitinated protein to ubiquitin chain architecture. *Cell & Bioscience*, 12(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00870-y>

Takahara, T., Amemiya, Y., Sugiyama, R., Maki, M., & Shibata, H. (2020). Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00679-2>

Telleria-Diaz, A., Grinevich, V. V., & Jirikowski, G. F. (2001). Colocalization of vasopressin and oxytocin in hypothalamic magnocellular neurons in water-deprived rats. *Neuropeptides*, 35(3–4), 162–167. <https://doi.org/10.1054/npep.2001.0859>

Thomas, D. R., Cote, T. R., Lawhorne, L., Levenson, S. A., Rubenstein, L. Z., Smith, D. A., Stefanacci, R. G., Tangalos, E. G., & Morley, J. E. (2008). Understanding Clinical Dehydration and Its Treatment. *Journal of the American Medical Directors Association*, 9(5), 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2008.03.006>

Thurston, J. H., Hauhart, R. E., Jones, E. M., & Ater, J. L. (1975). EFFECTS OF SALT AND WATER LOADING ON CARBOHYDRATE AND ENERGY METABOLISM AND LEVELS OF SELECTED AMINO ACIDS IN THE BRAINS OF YOUNG MICE ¹. *Journal of Neurochemistry*, 24(5), 953–957. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1975.tb03661.x>

Tong, J., Briggs, M. M., & McIntosh, T. J. (2012). Water Permeability of Aquaporin-4 Channel Depends on Bilayer Composition, Thickness, and Elasticity. *Biophysical Journal*, 103(9), 1899–1908. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.09.025>

Toschi, A., Severi, A., Coletti, D., Catizone, A., Musarò, A., Molinaro, M., Nervi, C., Adamo, S., & Scicchitano, B. M. (2011). Skeletal Muscle Regeneration in Mice

Is Stimulated by Local Overexpression of V1a-Vasopressin Receptor. *Molecular Endocrinology*, 25(9), 1661–1673. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1049>

Ugale, J., Mata, A., Meert, K. L., & Sarnaik, A. P. (2012). Measured degree of dehydration in children and adolescents with type 1 diabetic ketoacidosis*. *Pediatric Critical Care Medicine*, 13(2), e103–e107. <https://doi.org/10.1097/PCC.0b013e3182231493>

van der Vinne, V., Riede, S. J., Gorter, J. A., Eijer, W. G., Sellix, M. T., Menaker, M., Daan, S., Pilorz, V., & Hut, R. A. (2014). Cold and hunger induce diurnality in a nocturnal mammal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(42), 15256–15260. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413135111>

Vilhena-Franco, T., Mecawi, A. S., Almeida-Pereira, G., Lucio-Oliveira, F., Elias, L. L. K., & Antunes-Rodrigues, J. (2019). Oestradiol acts through its beta receptor to increase vasopressin neuronal activation and secretion induced by dehydration. *Journal of Neuroendocrinology*, 31(4). <https://doi.org/10.1111/jne.12712>

Vilhena-Franco, T., Mecawi, A. S., Elias, L. L. K., & Antunes-Rodrigues, J. (2016). Oestradiol effects on neuroendocrine responses induced by water deprivation in rats. *Journal of Endocrinology*, 231(2), 167–180. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0311>

Vom Dahl, S., DOMBROWSKI, F., SCHMITT, M., SCHLIESS, F., PFEIFER, U., & HÄUSSINGER, D. (2001). Cell hydration controls autophagosome formation in rat liver in a microtubule-dependent way downstream from p38MAPK activation. *Biochemical Journal*, 354(1), 31–36. <https://doi.org/10.1042/bj3540031>

Wakayama, Y., Jimi, T., Inoue, M., Kojima, H., Murahashi, M., Kumagai, T., Yamashita, S., Hara, H., & Shibuya, S. (2002). Reduced Aquaporin 4 Expression in the Muscle Plasma Membrane of Patients With Duchenne Muscular Dystrophy. *Archives of Neurology*, 59(3), 431. <https://doi.org/10.1001/archneur.59.3.431>

Wakerley, J. B., Poulain, D. A., & Brown, D. (1978). Comparison of firing patterns in oxytocin- and vasopressin-releasing neurones during progressive dehydration. *Brain Research*, 148(2), 425–440. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90730-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90730-8)

Watso, J. C., Babcock, M. C., Robinson, A. T., Migdal, K. U., Wenner, M. M., Stocker, S. D., & Farquhar, W. B. (2019). Water deprivation does not augment sympathetic or pressor responses to sciatic afferent nerve stimulation in rats or to static exercise in humans. *Journal of Applied Physiology*, 127(1), 235–245. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00005.2019>

Wei, F., Zhang, L., Ma, B., Li, W., Deng, X., Zheng, T., Wang, X., & Jing, Y. (2021). Oxytocin system driven by experiences modifies social recognition and neuron morphology in female BALB/c mice. *Peptides*, 146, 170659. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170659>

- Yadawa, A. K., & Chaturvedi, C. M. (2016). Expression of stress hormones AVP and CRH in the hypothalamus of *Mus musculus* following water and food deprivation. *General and Comparative Endocrinology*, 239, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.03.005>
- Yoo, J.-I., Choi, H., Song, S.-Y., Park, K.-S., Lee, D.-H., & Ha, Y.-C. (2018). Relationship between water intake and skeletal muscle mass in elderly Koreans: A nationwide population-based study. *Nutrition*, 53, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.01.010>
- Yoshimura, M., Conway-Campbell, B., & Ueta, Y. (2021). Arginine vasopressin: Direct and indirect action on metabolism. *Peptides*, 142, 170555. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170555>
- Yuan, J., Zhang, R., Wu, R., Gu, Y., & Lu, Y. (2020). The effects of oxytocin to rectify metabolic dysfunction in obese mice are associated with increased thermogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 514, 110903. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110903>
- Zaytsoff, S. J. M., Brown, C. L. J., Montana, T., Metz, G. A. S., Abbott, D. W., Uwiera, R. R. E., & Inglis, G. D. (2019). Corticosterone-mediated physiological stress modulates hepatic lipid metabolism, metabolite profiles, and systemic responses in chickens. *Scientific Reports*, 9(1), 19225. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52267-6>
- Zhang, Z., Zhao, L. D., Johnson, S. E., Rhoads, M. L., Jiang, H., & Rhoads, R. P. (2019). Oxytocin is involved in steroid hormone–stimulated bovine satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Domestic Animal Endocrinology*, 66, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2018.07.003>
- Zhao, J., Zhai, B., Gygi, S. P., & Goldberg, A. L. (2015). mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(52), 15790–15797. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521919112>
- Zimmerman, C. A., Leib, D. E., & Knight, Z. A. (2017). Neural circuits underlying thirst and fluid homeostasis. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(8), 459–469. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.71>

APÊNDICES

Material para divulgação nas mídias sociais do PROCFIS.

PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

SE LIGA NA PESQUISA

TÍTULO DO TRABALHO

REPERCUSSÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELA PRIVAÇÃO HÍDRICA EM CAMUNDONGOS E O PAPEL DA SINALIZAÇÃO OCITOCINÉRGICA NA MANUTENÇÃO DA MASSA MUSCULAR

DISCENTE: M.V. JOÃO DA CRUZ FILHO
ORIENTADOR: PROF. DR. DANILLO LUSTRINO BORGES
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ANDRÉ DE SOUZA MECARI (UNFESP)

<http://www.esaquadra.ufr.br/procfis>

PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

A DESIDRATAÇÃO

É uma causa de perturbação ao equilíbrio fisiológico em qualquer organismo vivo.

Acontece quando não há ingestão apropriada de água, seja de forma aguda (pontual) ou crônica (contínua).

Causa mudanças no metabolismo, isto é, na forma como o organismo utiliza sua reserva energética para manter o equilíbrio.

Pouco se sabe sobre os mecanismos precisos que contribuem para a adaptação do metabolismo sistêmico e muscular à desidratação!

PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

NOSSOS OBJETIVOS

Caracterizar o efeito da privação hídrica aguda (36h) sobre o metabolismo energético sistêmico e proteico muscular esquelético.

Avaliar a possível contribuição da hipersecreção endógena de ocitocina no modelo para a manutenção do metabolismo proteico muscular.

PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

METODOLOGIA

CONTROLE Água ad libitum / Água ad libitum
WD Rato sem água / Privação hídrica 36h
WD+OXT Rato sem água / Privação hídrica 36h + Ocitocina 100 µg

1. Análise metabólica
2. Rato
3. 48% de água corporal
4. Rato
5. Rato

6. Rato
7. Rato

8. Rato
9. Rato

10. Rato

11. Rato

12. Rato

13. Rato

14. Rato

15. Rato

16. Rato

17. Rato

18. Rato

19. Rato

20. Rato

21. Rato

22. Rato

23. Rato

24. Rato

25. Rato

26. Rato

27. Rato

28. Rato

29. Rato

30. Rato

31. Rato

32. Rato

33. Rato

34. Rato

35. Rato

36. Rato

37. Rato

38. Rato

39. Rato

40. Rato

41. Rato

42. Rato

43. Rato

44. Rato

45. Rato

46. Rato

47. Rato

48. Rato

49. Rato

50. Rato

51. Rato

52. Rato

53. Rato

54. Rato

55. Rato

56. Rato

57. Rato

58. Rato

59. Rato

60. Rato

61. Rato

62. Rato

63. Rato

64. Rato

65. Rato

66. Rato

67. Rato

68. Rato

69. Rato

70. Rato

71. Rato

72. Rato

73. Rato

74. Rato

75. Rato

76. Rato

77. Rato

78. Rato

79. Rato

80. Rato

81. Rato

82. Rato

83. Rato

84. Rato

85. Rato

86. Rato

87. Rato

88. Rato

89. Rato

90. Rato

91. Rato

92. Rato

93. Rato

94. Rato

95. Rato

96. Rato

97. Rato

98. Rato

99. Rato

100. Rato

PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

NOSSOS RESULTADOS DEMONSTRARAM QUE A DESIDRATAÇÃO:

1. CAUSOU PERDA DE MASSA CORPORAL;
2. DIMINUIU A INGESTÃO ALIMENTAR;
3. DIMINUIU A MASSA DO FÍGADO;
4. TENDÊNCIA AUMENTAR A GASTURA;
5. AUMENTOU A COLESTEROLÉMIAS;
6. CAUSOU QUESO DE PROTEÍNAS EM UM TIPO MUSCULAR, MAS SEM ALTERAR A TAXA DE QUEIMA PROTEICA;
7. E A SINALIZAÇÃO OCITOCINÉRGICA PARECE NÃO CONTRIBUIR PARA A MANUTENÇÃO DA MASSA MUSCULAR INDIVIDUAL.

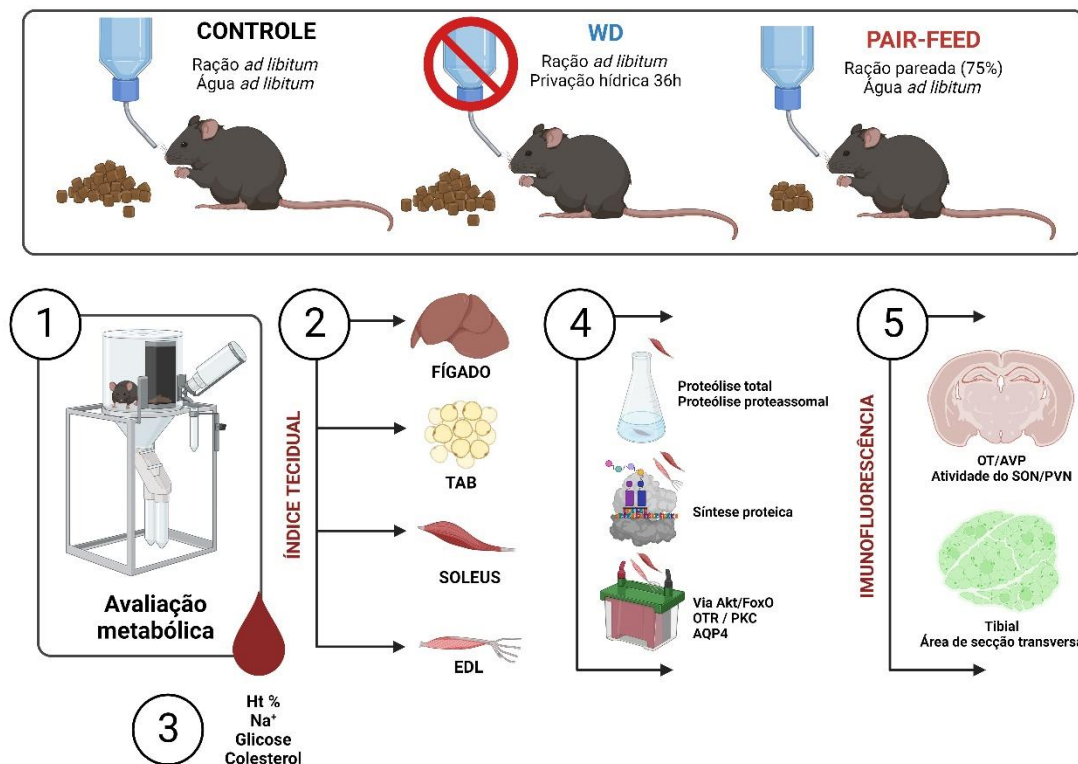
PROCFIS

PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CONCLUSÃO

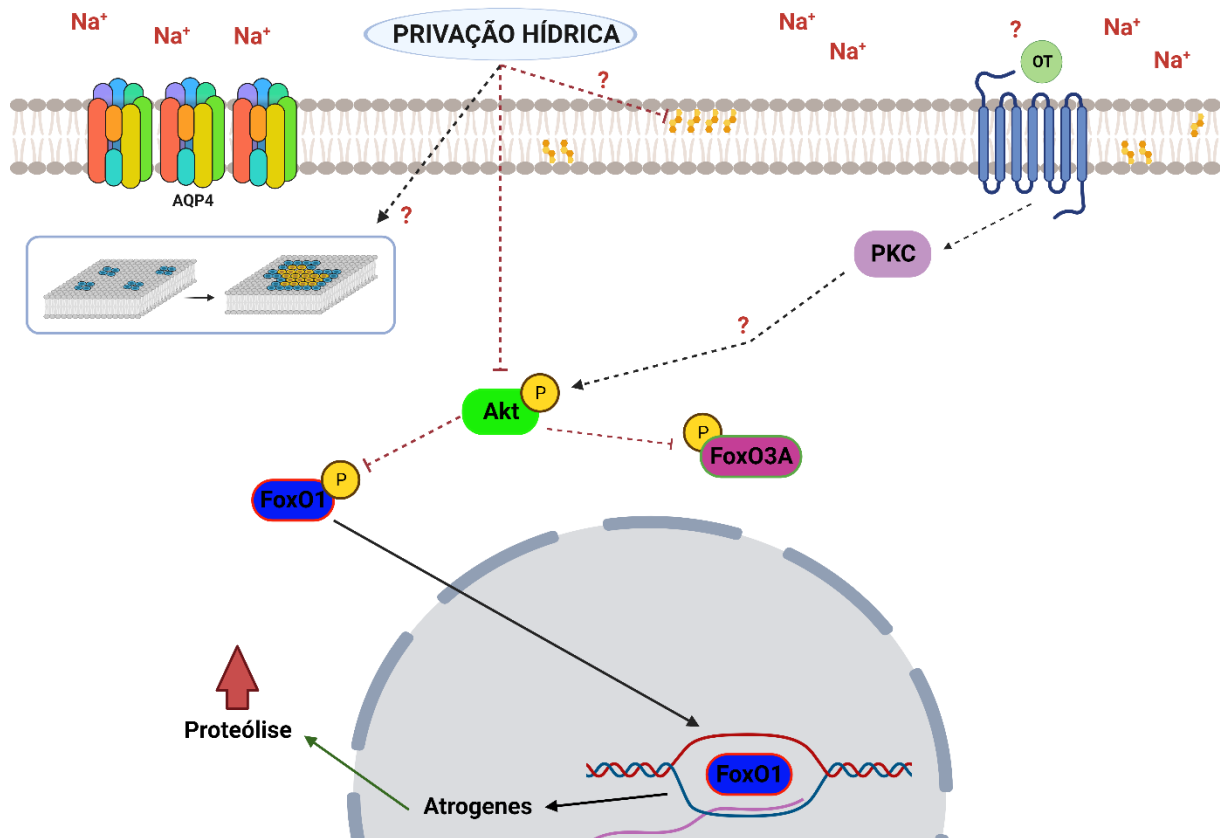
Em conjunto, esses dados indicam que a desidratação causa uma utilização mista de substratos para obtenção de energia, diminuindo a reserva sistêmica e muscular e causando um prejuízo no metabolismo energético normal.

Esquematisação da metodologia do trabalho



Esquematisação da metodologia utilizada para avaliação das repercussões metabólicas induzidas pela privação hídrica de 36 h em camundongos. Os animais foram submetidos à privação hídrica e alimentação pareada e, em seguida, passaram por avaliação de parâmetros fisiológicos (1; massa corporal e ingestão hídrica e alimentar) e hematológico-bioquímicos (2). Além disso, averiguou-se o índice de diferentes tecidos de importância metabólica (3), bem como a estimativa de atividade de degradação e síntese proteica no músculo esquelético (4) e área de secção transversa de fibras musculares e atividade de neurônios secretores de ocitocina e vasopressina no hipotálamo (5).

Esquematização dos resultados encontrados no músculo esquelético



Esquematização dos resultados parciais observados nesse estudo, no tangente ao metabolismo de proteínas do músculo esquelético. A privação hídrica reduziu a fosforilação da proteína Akt, levando ao aumento na atividade de FoxO1 e consequente aumento de proteólise total e proteassomal. A sinalização ocitocinérgica não parece ter contribuído para a manutenção da massa muscular, mas é possível que o tecido tenha retido água por meio do transporte de fluidos através do canal aquaporina 4, resultado de menor saturação de colesterol na membrana sarcoplasmática.

ANEXOS



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DA OCITOCINA NO METABOLISMO PROTEICO EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE CAMUNDONGOS FÊMEAS DESIDRATADAS E LACTANTES", protocolada sob o CEUA nº 4492070222 (ID 000469), sob a responsabilidade de **Danilo Lustrino Borges** e equipe; *João da Cruz Filho; Daniely Messias Costa; Tatiane de Oliveira Santos; Raquel Prado da Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 18/02/2022.

We certify that the proposal "OXYTOCIN EFFECT ON SKELETAL MUSCLE PROTEIN METABOLISM OF DEHYDRATED AND LACTATING FEMALE MICE", utilizing 388 Heterogenics mice (10 males and 378 females), protocol number CEUA 4492070222 (ID 000469), under the responsibility of **Danilo Lustrino Borges and team; João da Cruz Filho; Daniely Messias Costa; Tatiane de Oliveira Santos; Raquel Prado da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 02/18/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2022** a **12/2025** Área: **Fisiologia**

Origem:	Biotério da Universidade Federal de Sergipe			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade: 3 a 4 meses N: 378
Linhagem:	C57BL/6			Peso: 30 a 35 g
Origem:	Biotério da Universidade Federal de Sergipe			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos	idade: 3 a 4 meses N: 10
Linhagem:	C57BL/6			Peso: 30 a 35 g

Local do experimento: Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental, Depart. Fisiologia, UFS.

São Cristóvão, 18 de fevereiro de 2022

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe