

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Carlos Alberto Arcaro Filho

INIBIDORES DE FOSFODIESTERASES E O CONTROLE DE PROCESSOS
PROTEOLÍTICOS NA ATROFIA MUSCULAR INDUZIDA PELO DIABETES MELLITUS

ORIENTADORA: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

ARARAQUARA – SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Carlos Alberto Arcaro Filho

Inibidores de Fosfodiesterases e o Controle de Processos Proteolíticos na
Atrofia Muscular Induzida pelo Diabetes Mellitus

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

ORIENTADORA: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

ARARAQUARA - SP

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e
Documentação Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A668i Arcaro Filho, Carlos Alberto
Inibidores de Fosfodiesterases e o Controle de Processos Proteolíticos na Atrofia
Muscular Induzida pelo Diabetes Mellitus / Carlos Alberto Arcaro Filho. – Araraquara, 2018.
154 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento em Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Amanda Martins Baviera.

1. Atrofia muscular. 2. Fosfodiesterase do tipo 4. 3. Rolipram. 4. Pentoxifilina. 5. AMP cíclico.
6. PKA. 7. EPAC. 8. AKT. 9. Diabetes Mellitus. I. Baviera, Amanda Martins, orient. II. Título.

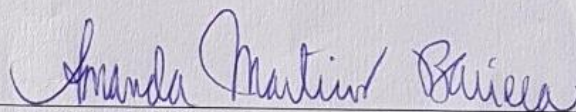
CARLOS ALBERTO ARCARO FILHO

INIBIDORES DE FOSFODIESTERASES E O CONTROLE DE PROCESSOS
PROTEOLÍTICOS NA ATROFIA MUSCULAR INDUZIDA PELO DIABETES
MELLITUS

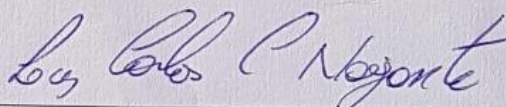
Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista –
UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a
obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 27 de abril de 2018.

BANCA EXAMINADORA



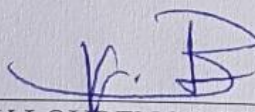
AMANDA MARTINS BAVIERA - Orientadora



LUIS CARLOS CARVALHO NAVEGANTES



MARCELO TADEU MARIN



IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI

JULIO CESAR BATISTA FERREIRA
(participação por vídeo-conferência)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela vida, pelo amor e pela força, por estar sempre no meu caminho me abençoando, iluminando e guiando em tudo o que tenho feito.

Aos meus pais **Carlos Alberto Arcaro** e **Geni Peres Torres**, e aos meus novos pais que Deus me colocou na minha vida, **Claudio Torres** (padrasto) e **Katia Critina Tales de Oliveira Arcaro** (madrasta) que foram à base de tudo pra mim, apoiando-me nos momentos difíceis com força, confiança, amor, ensinando-me a persistir nos meus objetivos e ajudando a alcançá-los e sempre orando por mim nos momentos que precisava.

Aos meus irmãos **Hugo Arcaro Neto** e o pequenininho **Daniel Tales Arcaro** e minha cunhada **Luciene Pianta Alves Arcaro** pela companhia, carinho e momentos de descontração vividos a cada dia, que nos ajudaram a superar as diferenças e viver por todos estes anos.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, que através do convênio FAPESP/CAPES financiou este projeto (Processo 2013/18861-2), a Bolsa Regular de doutorado (Processo 2014/12202-0) e a Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE (Processo 2017/02348-5).

A **Profa. Dra. Amanda Martins Baviera**, pela orientação e por ter acreditado que eu possuía capacidade para desenvolver este projeto, por ter me ajudado nos experimentos, nas padronizações de metodologias, na análise dos dados, na escrita do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti**, pelos anos de convivência a paciência, os conselhos, as piadas, os apelidos, o apoio e o aprendizado.

A minha companheira de laboratório **Dra. Renata Pires de Assis**, pelos momentos felizes, tristes, as brincadeiras, as risadas, os conselhos o apoio, mas

principalmente pela amizade. Por me auxiliar e ajudar nos experimentos e padronizações que enfrentei durante o doutorado, sempre disposta a me ajudar.

Aos demais companheiros de laboratório e alguns de biotério **Dra. Vânia Ortega Guitierres, Dra. Thais Fernanda Moreira, Monalisa Freitas de Paula, Mariana de Campos da Costa, Tayra Ferreira Oliveira de Lima e Maiara Destro Inácio**. Pelo apoio convivência, risadas e os bons momentos que passamos juntos.

A **Profa. Dr. Isis do Carmos Ketelhut** e ao **Prof Dr. Luis Carlos de Carvalho Navegantes**, pelo apoio dado durante a realização deste projeto, abrindo seus laboratórios para que eu aprender algumas metodologias que foram implementadas e utilizadas neste trabalho.

A **Neusa Maria Zanon**, que sempre esteve disposta a me ajudar e ensinar o que foi necessário para execução deste projeto, sempre preocupada na execução perfeita das metodologias que me ensinou e aquisição se os resultados obtidos foram bons.

A **Dra. Silvia de Paula Gomes** e **Dr. Dawit Albiero Pinheiro Gonçalves**, pelos conselhos, ajudas, ensinamentos durante esses 4 anos.

Ao **Prof. Dr. Marco Sandri**, por ter aberto as portas do seu laboratório no Instituto Veneto de Biologia Molecular, na cidade de Padova, Itália, permitindo um crescimento pessoal e científico durante os 8 meses que estive junto ao seu grupo de pesquisa.

Ao **Dr. Andrea Armani**, que me recebeu em Padova e durante todo o período me ajudou em tudo, me ensinou o italiano e foi o responsável pela obtenção dos resultados obtidos durante o estágio.

A todos os meus familiares e amigos que já passaram pela minha vida. Que me apoiaram e me mostraram como é bom viver ao lado de pessoas amadas.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| LISTA DE FIGURAS | 5 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 8 |
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 14 |
| 2.1. Músculo esquelético | 14 |
| 2.2. <i>Turnover</i> de proteínas | 15 |
| 2.3. Sistemas proteolíticos | 16 |
| 2.3.1. Sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma | 16 |
| 2.3.2. Sistema proteolítico autofágico-lisossomal..... | 18 |
| 2.3.3. Sistema proteolítico dependente de calpaínas | 20 |
| 2.3.4. Sistema proteolítico dependente de caspases | 21 |
| 2.4. Atrofia muscular | 22 |
| 2.5. Agonistas β -adrenérgicos..... | 23 |
| 2.6. Inibidores de fosfodiesterases | 25 |
| 2.7. Sinalização intracelular dependente de AMPc | 26 |
| 3. OBJETIVOS | 29 |
| 3.1. Objetivo geral | 29 |
| 3.2. Objetivos específicos | 29 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 4.1. Experimento I: Efeito do tratamento de ratos diabéticos com inibidores de fosfodiesterases (pentoxifilina ou rolipram) no controle do metabolismo proteico na musculatura esquelética..... | 31 |
| 4.1.1. Desenho experimental | 31 |

| | |
|---|----|
| 4.1.2. Teste de tolerância oral à glicose | 33 |
| 4.1.3. Avaliação do efeito direto do rolipram e de agonistas de PKA e EPAC na ativação de PKA e AKT e controle da proteólise na musculatura esquelética..... | 34 |
| 4.1.4. Determinação de glicose pelo método da glicose oxidase | 35 |
| 4.1.5. Determinação de insulina sérica e citocinas TNF- α e IL-1 β | 35 |
| 4.1.6. Dosagem de tirosina | 36 |
| 4.1.7. Atividade quimotripsina- <i>like</i> do proteassoma..... | 36 |
| 4.1.8. Atividade de calpaínas | 36 |
| 4.1.9. Atividade de caspase-3..... | 37 |
| 4.1.10. Curva analítica de 7-amino-4-metilcumarina | 38 |
| 4.1.11. Determinação do conteúdo de AMPc..... | 38 |
| 4.1.12. Alterações nos níveis proteicos e/ou níveis de fosforilação de componentes dos sistemas proteolíticos, efetores intracelulares e fatores de transcrição | 39 |
| 4.2. Experimento II: Avaliação do papel de PDE4D no controle da via autofágica-lisossomal em músculos de camundongos alimentados ou jejuados | 40 |
| 4.2.1. Preparo do RNA de interferência para silenciamento de PDE4D..... | 40 |
| 4.2.2. Transfecção dos SiRNA em células C2C12..... | 41 |
| 4.2.3. Eletroporação do SiRNA para PDE4D em músculos de camundongos – desenho experimental | 42 |
| 4.2.4. Avaliação do fluxo autofágico em músculos esqueléticos..... | 42 |
| 4.2.5. Análise da expressão gênica de PDE4D, LC3b e p62..... | 43 |
| 4.2.6. Análise da área das fibras musculares transfectadas..... | 43 |
| 4.3. Análise estatística | 44 |
| 5. RESULTADOS | 45 |
| 5.1. Efeito do tratamento de ratos diabéticos com inibidores de fosfodiesterases (pentoxifilina e rolipram) no controle do metabolismo proteico na musculatura esquelética..... | 45 |

| | |
|---|-----|
| 5.1.1. Avaliação das alterações nos processos proteolíticos e efetores intracelulares em <i>soleus</i> de animais normais e diabéticos tratados com 2 mg/kg de rolipram | 48 |
| 5.1.2. Avaliação do efeito direto do rolipram e de agonistas de PKA e EPAC em músculos <i>soleus</i> de animais normais e diabéticos | 57 |
| 5.1.3. Avaliação das alterações nos processos proteolíticos e efetores intracelulares em EDL de animais normais e diabéticos tratados com 2 mg/kg de rolipram. | 63 |
| 5.1.4. Avaliação do efeito direto do rolipram e de agonistas de PKA e EPAC em músculos EDL de animais normais e diabéticos | 71 |
| 5.2. Experimento II: Avaliação do papel de PDE4D no controle do sistema autofágico-lisossomal em músculos de camundongos alimentados ou jejuados | 77 |
| 5. DISCUSSÃO | 84 |
| 6. CONCLUSÕES | 98 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 100 |
| 8. ANEXO | 123 |
| 8.1. ANEXO I - Carta de aprovação pelo CEUA | 123 |
| 8.2. ANEXO II – Padronização da dose de estreptozotocina | 124 |
| 8.3. ANEXO III - Padronização da dose de rolipram | 129 |
| 8.4. Artigo publicado – <i>Involvement of cAMP/EPAC/Akt signaling in the antiproteolytic effects of pentoxifylline on skeletal muscles of diabetic rats</i> | 132 |

RESUMO

Considerando os avanços no conhecimento acerca dos mecanismos que controlam o metabolismo de proteínas na musculatura esquelética que permitiram a busca por novas opções para o tratamento das atrofia muscular, o presente estudo teve como objetivo a compreensão do potencial antiproteolítico de inibidores de fosfodiesterase, PDE (pentoxifilina, inibidor não-seletivo de PDE; rolipram, inibidor seletivo de PDE4) em músculos esqueléticos de ratos submetidos à atrofia muscular devido à insuficiência insulínica (diabetes mellitus experimental), com ênfase na elucidação da participação de componentes da sinalização do AMP cíclico (AMPC) nesta resposta. Ratos normais e diabéticos (60 mg/kg de estreptozotocina, administração intravenosa) foram tratados com salina (NS e DS) ou com 2 mg/kg de rolipram (NROL e DROL), ou com 25 mg/kg de pentoxifilina (NPTX e DPTX) durante 3 dias, por via intraperitoneal. Após três dias de tratamento, músculos *soleus* e *extensor digitorum longus* (EDL) foram removidos, pesados, congelados e processados para diversas análises: (i) conteúdo de AMPC (ensaio imunoenzimático); (ii) atividades das proteases proteassoma, calpaínas e caspase-3 (uso de substratos específicos fluorogênicos); (iii) níveis proteicos e/ou níveis de fosforilação de componentes das vias proteolíticas, efetores intracelulares sinalizatórios e fatores de transcrição (*Western blotting*); (iv) determinação dos níveis séricos de insulina e citocinas pró-inflamatórias. Foram realizados experimentos *ex-vivo*, para verificar a ação direta dos fármacos no controle da proteólise muscular e ativação de efetores intracelulares, via incubações dos músculos na presença de rolipram ou de agonistas de EPAC (*Exchange protein directly activated by cAMP*) e de PKA (proteína quinase dependente de AMPC), proteínas efetoras ativadas pelo AMPC. Também foram realizados experimentos no Laboratório do Prof. Dr. Marco Sandri, no *Venetian Institute of Molecular Medicine*, Padova, Itália, para a avaliação do papel de PDE4D no controle do processo autofágico-lisossomal em músculos esqueléticos de camundongos jejuados. Os tratamentos de animais diabéticos com rolipram (DROL) ou com pentoxifilina (DPTX) promoveram uma redução nas atividades do proteassoma e calpaínas em *soleus* e EDL, bem como nos níveis de componentes-chave do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (MuRF-1, atrogin-1, conjugados poliubiquitinados), e aumento nos níveis de calpastatina (inibidor das calpaínas). Interessante ressaltar que o grupo DROL apresentou redução na atividade e níveis proteicos de caspase-3, em ambos os músculos, enquanto que o grupo DPTX apenas em músculos EDL. Contribuindo com a redução observada na atividade de caspase-3, houve uma redução nos níveis de Bax (proteína pró-apoptótica) e aumento nos níveis de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) em ambos os músculos de animais DROL. Animais diabéticos tratados com salina (DS) apresentaram aumento nas atividades das três proteases, bem como nos níveis de componentes participantes destes processos proteolíticos. Animais normais e diabéticos tratados com salina (NS e DS) apresentaram níveis de AMPC basais e semelhantes entre si, tanto em *soleus* quanto em EDL, enquanto que os tratamentos de ratos normais e diabéticos com pentoxifilina (NPTX e DPTX) ou rolipram (NROL e DROL) promoveram aumentos de AMPC, em ambos os músculos. Um dos mecanismos que podem estar envolvidos na inibição da proteólise muscular após aumentos nas concentrações de AMPC envolve a proteína EPAC, responsável por integrar a sinalização do AMPC e a sinalização insulínica via ativação da quinase AKT. Animais diabéticos tratados com pentoxifilina ou com rolipram apresentaram aumento nos níveis proteicos de EPAC 1 e na fosforilação de AKT, quando comparados ao grupo DS. Observamos também um aumento na fosforilação inibitória de fatores de transcrição

FoxO 1 e 3a em ambos os músculos de animais DROL. Podemos sugerir que parte das ações de rolipram que culminaram em ativação de AKT e inibição de FoxO na musculatura esquelética possam estar associadas aos aumentos observados nos níveis circulantes de insulina em animais DROL. Investigamos, apenas nos animais tratados com rolipram, a possibilidade de participação da proteína PKA no controle da proteólise muscular. Em animais DROL houve ativação da PKA, verificada tanto pelo aumento na fosforilação de substratos de PKA, bem como do fator de transcrição CREB, em *soleus* e EDL. Vale destacar que animais DS apresentaram níveis reduzidos de p-CREB e de substratos fosforilados por PKA em *soleus* e EDL. Animais diabéticos tratados com os inibidores de PDE apresentaram uma diminuição de citocinas pró-inflamatórias séricas (TNF- α , PTX e ROL; IL-1 β , ROL) e aumento nos níveis de insulina sérica (ROL) em relação aos animais DS. Nos estudos *ex vivo*, as incubações de músculos *soleus* e EDL com rolipram levaram a uma redução da proteólise total, bem como aumento na fosforilação de substratos de PKA e de AKT. Músculos *soleus* e EDL incubados com agonistas de EPAC apresentaram aumento na fosforilação de AKT, enquanto que a incubação com agonista de PKA promoveu aumento na fosforilação dos substratos de PKA (em ambos os músculos) e aumento na fosforilação de AKT (apenas em EDL), quando comparados aos músculos incubados na ausência do fármaco. Nos estudos para compreensão do papel de PDE4D no controle do processo autofágico-lisossomal, observou-se que o silenciamento gênico da PDE4D em músculos *tibialis anterior* promoveu uma preservação da massa muscular e da área da fibra em animais jejuados, quando comparados ao músculo controle. Músculos *flexor digitorum brevis*, silenciados para PDE4D, apresentaram diminuição na expressão de proteínas-chave do processo autofágico-lisossomal, tais como LC3 e p62. Estes resultados evidenciam os mecanismos que podem estar envolvidos na ação direta de inibidores de PDE no controle do metabolismo proteico muscular esquelético, via ativação de duas vias dependentes de AMPc: (i) a via PKA/CREB, que pode participar do controle da transcrição de Bcl-2 e calpastatina, bem como na inativação direta de caspases, inibindo assim os processos proteolíticos dependentes de caspase-3 e calpaínas, (ii) a via EPAC/AKT, via fosforilação e inibição de FoxO 1 e 3A, regulando a expressão dos atrogenes (MuRF-1 e atrogin-1) e promovendo uma diminuição na atividade do sistema ubiquitina-proteassoma. Além disso, o tratamento com inibidores de PDE diminuem o processo inflamatório e aumentam os níveis circulantes de insulina, ações que podem contribuir para os efeitos antiproteolíticos. Evidências iniciais também sugerem que PDE4D participa no controle do sistema autofágico-lisossomal na musculatura esquelética. Todos estes resultados indicam que PDE participam no controle de processos proteolíticos, portanto inibidores de PDE emergem como uma opção interessante na ativação da sinalização do AMPc na musculatura esquelética, com vistas à utilização futura no tratamento de quadros de perda de massa muscular durante situações de atrofia.

Palavras-chave: Atrofia muscular. Fosfodiesterase do tipo 4. Rolipram. Pentoxifilina. AMP cíclico. PKA. EPAC. AKT. Diabetes mellitus.

ABSTRACT

Considering the advances in the knowledge of the mechanisms controlling the protein metabolism in skeletal muscles that allowed the discover of new options for the treatment of muscle atrophies, the present study aimed to understand the antiproteolytic potential of phosphodiesterase (PDE) inhibitors (pentoxifylline, a non-selective PDE inhibitor; rolipram, a selective PDE 4 inhibitor), in skeletal muscles of rats submitted to muscle atrophy due to insulin insufficiency (experimental diabetes mellitus), with emphasis on the elucidation of the participation of cyclic AMP (cAMP) signaling components. Normal and diabetic rats (60 mg/kg streptozotocin, intravenous administration) were treated intraperitoneally with saline (NS and DS) or with 2 mg/kg rolipram (NROL and DROL) or with 25 mg/kg pentoxifylline (NPTX and DPTX) for 3 days. After three days of treatments, *soleus* and *extensor digitorum longus* (EDL) muscles were removed, weighed, frozen and processed for several analyzes: (i) cAMP content; (ii) activities of proteasome, calpain and caspase-3 (use of specific fluorogenic substrates); (iii) protein levels and/or phosphorylation levels of components of proteolytic pathways, intracellular signaling effectors and transcription factors (Western blotting); (iv) determination of serum insulin and proinflammatory cytokines levels. *Ex vivo* experiments were performed to verify the direct action of the drugs in the control of muscle proteolysis and activation of intracellular effectors, via muscle incubations in the presence of rolipram or agonists of EPAC (Exchange protein directly activated by cAMP) and PKA (cAMP-dependent protein kinase), intracellular effectors activated by cAMP. Experiments were also carried out in the Laboratory of Prof. Dr. Marco Sandri at the Venetian Institute of Molecular Medicine, Padova, Italy, for the evaluation of the role of PDE4D in controlling the autophagic-lysosomal process in skeletal muscles of starved mice. Treatments of diabetic animals with rolipram (DROL) or pentoxifylline (DPTX) promoted a reduction in the activities of proteasome and calpain in *soleus* and EDL, as well as reduced the levels of key components of the ubiquitin-proteasome system (MuRF-1, atrogin-1, polyubiquitinated conjugates), and increased the levels of calpastatin (calpain inhibitor). Interestingly, DROL rats showed a reduction in the activity and in the protein levels of caspase-3 in both muscles, whereas DPTX rat had reductions only in EDL muscles. Contributing to the reduction in caspase-3 activity, it was observed a reduction in the content of Bax (pro-apoptotic protein) and an increase of Bcl-2 (anti-apoptotic protein) in both muscles of DROL rats. Diabetic animals treated with saline (DS) showed an increase in the activities of the three proteases, as well as increases in the levels of components belonging to these proteolytic processes. Normal and diabetic animals treated with saline (NS and DS) had basal and similar levels of cAMP in both *soleus* and EDL, whereas the treatments of normal and diabetic rats with pentoxifylline (NPTX and DPTX) or with rolipram (NROL and DROL) promoted increases in cAMP in both muscles. One of the mechanisms that may be involved in the muscle proteolysis inhibition after increases in cAMP involves the EPAC protein, responsible for integrating the cAMP and the insulin signaling pathways via AKT activation. Diabetic animals treated with pentoxifylline or with rolipram showed an increase in the protein levels of EPAC 1 and in the phosphorylation of AKT, when compared with the DS group. We also observed an increase in the phosphorylation (inhibitory) of FoxO 1 and 3a in both muscles of DROL rats. It can be suggested that part of the rolipram actions causing AKT activation and FoxO inhibition in skeletal muscles may be associated with the increases in the circulating levels of insulin observed in DROL animals. It was investigated, only in animals treated with rolipram,

the possible involvement of PKA in the control of muscle proteolysis. DROL rats had activation of PKA, verified both by the increase in the phosphorylation of PKA substrates, as well as in the phosphorylation of the transcription factor CREB, in *soleus* and EDL. DS rats had decreased levels of p-CREB and of the PKA substrates, in *soleus* and EDL. Diabetic animals treated with PDE inhibitors showed a decrease in serum proinflammatory cytokines (TNF- α , PTX and ROL; IL-1 β , ROL) when compared with DS. In *ex vivo* studies, incubations of *soleus* and EDL with rolipram caused a reduction of the total proteolysis as well as an increase in the phosphorylation of PKA substrates and of AKT. *Soleus* and EDL muscles incubated with EPAC agonist showed increased in the AKT phosphorylation, whereas incubation with PKA agonist promoted an increase in the phosphorylation of PKA substrates (in both muscles) and an increase in the AKT phosphorylation (EDL), when compared with muscles incubated in the absence of the drugs. In studies to understand the role of PDE4D in the control of the autophagic-lysosomal process, it was observed that the PDE4D gene silencing in *anterior tibialis* muscles caused a preservation of the muscle mass and fiber area in fasted animals when compared with control muscle. *Flexor digitorum brevis* muscles, silenced for PDE4D, showed a decreased expression of key proteins of the autophagic-lysosomal process, such as LC3 and p62. These results suggested the mechanisms that may be involved in the direct action of PDE inhibitors in the control of skeletal muscle protein metabolism, through activation of two cAMP-dependent pathways: (i) the PKA/CREB pathway, which may participate in transcriptional control of Bcl-2 and calpastatin, as well as causing direct inactivation of caspases, thus inhibiting the proteolytic processes dependent on caspase-3 and calpains, (ii) the EPAC/AKT pathway, via phosphorylation and inhibition of FoxO 1 and 3a factors, regulating the expression of atrogenes (MuRF-1 and atrogenin-1) and promoting a decrease in activity of ubiquitin-proteasome system. Treatments with PDE inhibitors also decreased the inflammatory process and increased the circulating insulin levels, which may be contributing to the antiproteolytic responses. Initial evidence also suggests that PDE4D participates in the control of the autophagy-lysosomal system in skeletal muscles. All these results indicate that PDE participate in the control of proteolytic processes, therefore PDE inhibitors emerge as an interesting option to activate the cAMP signaling in the skeletal muscles, which may be used in the future in treatments muscle mass loss during atrophy situations.

Key words: Muscle atrophy. Phosphodiesterase type 4. Rolipram. Pentoxifylline. Cyclic AMP. PKA. EPAC. AKT. diabetes mellitus.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Representação esquemática do sistema ubiquitina-proteassoma..... | 17 |
| Figura 2: Representação esquemática da via Autofágica-lisossomal..... | 20 |
| Figura 3: Curva analítica de AMC. | 38 |
| Figura 4: Valores médios de peso corporal (A) e variação de peso corporal (B) de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram..... | 46 |
| Figura 5: Valores médios de glicemia (A), insulina (B), TTGO (C) e AUC (D) de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram..... | 47 |
| Figura 6: Níveis séricos de TNF- α (A) e IL-1 β (B) de ratos normais e diabéticos tratados após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 48 |
| Figura 7: Valores médios de peso de músculos <i>soleus</i> (g/100g) de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 49 |
| Figura 8: Atividades quimotripsina-like do proteassoma (A), de calpaínas (B) e de caspase-3 (C) (nmol AMC.mg proteína ⁻¹ .min ⁻¹) em músculos <i>soleus</i> de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 50 |
| Figura 9: Níveis proteicos de MuRF-1 (A), atrogin-1 (B) e conjugados ubiquitinados (C) em músculos <i>soleus</i> de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 51 |
| Figura 10: Níveis proteicos de m-calpaína (A) e calpastatina (B) em músculos <i>soleus</i> de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 52 |
| Figura 11: Níveis proteicos de caspase-3 (A), Bax (B) e Bcl-2 (C) em músculos <i>soleus</i> de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 53 |
| Figura 12: Níveis de AMPc em músculos <i>soleus</i> de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 54 |
| Figura 13: Níveis proteicos e/ou de fosforilação de substratos de PKA (A), CREB (B), EPAC1 (C), AKT (D), FoxO1 (E) e FoxO3a (F) em músculos <i>soleus</i> de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 56 |
| Figura 14: Níveis de fosforilação de AKT (A) e de substratos de PKA (B) em músculos <i>soleus</i> de ratos normais incubados na ausência ou na presença de rolipram (100 μ M), em diferentes tempos. | 58 |

| | |
|--|----|
| Figura 15: Proteólise total (A), conteúdo de AMPc (B), níveis de fosforilação de substratos de PKA (C) e de fosforilação de AKT (D) de músculos <i>soleus</i> de ratos normais e diabéticos incubados na ausência e presença de rolipram (100 µM)..... | 60 |
| Figura 16: Níveis de fosforilação de substratos de PKA (A) e de fosforilação de AKT (B) de músculos <i>soleus</i> de ratos normais e diabéticos incubados na ausência e presença de 6-Bnz-cAMP-AM (agonista de PKA, 16,6 µM). | 61 |
| Figura 17: Níveis de fosforilação de substratos de PKA (A) e de fosforilação de AKT (B) de músculos <i>soleus</i> de ratos normais e diabéticos incubados na ausência e presença de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM (agonista de EPAC, 16,6 µM)..... | 62 |
| Figura 18: Valores médios de peso de músculos EDL (g/100g) de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 63 |
| Figura 19: Atividades quimotripsina-like do proteassoma (A), de calpaínas (B) e de caspase-3 (C) (nmol AMC.mg proteína ⁻¹ .min ⁻¹) em músculos EDL de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 64 |
| Figura 20: Níveis proteicos de MuRF-1 (A), atrogin-1 (B) e conjugados ubiquitinados (C) em músculos EDL de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 65 |
| Figura 21: Níveis proteicos de m-calpaína (A) e calpastatina (B) em músculos EDL de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 66 |
| Figura 22: Níveis de proteicos de caspase-3 (A), Bax (B) e Bcl-2 (C) em músculos EDL de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 67 |
| Figura 23: Níveis de AMPc em músculos EDL de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram..... | 68 |
| Figura 24: Níveis proteicos e/ou de fosforilação de substratos de PKA (A), CREB (B), EPAC1 (C), AKT (D), FoxO1 (E) e FoxO3a (F) em músculos EDL de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram. | 70 |
| Figura 25: Níveis de fosforilação de AKT (A) e de substratos de PKA (B) de músculos EDL de ratos normais incubados na ausência e presença de rolipram (100 µM) em diferentes tempos..... | 72 |
| Figura 26: Proteólise total (A), conteúdo de AMPc (B), níveis de fosforilação de substratos de PKA (C) e de fosforilação de AKT (D) de músculos EDL de ratos normais e diabéticos incubados na ausência e presença de rolipram (100 µM)..... | 74 |
| Figura 27: Níveis de fosforilação de substratos de PKA (A) e de fosforilação de AKT (B) de músculos EDL de ratos normais e diabéticos incubados na ausência e presença de 6-Bnz-cAMP-AM (agonista de PKA, 16,6 µM). | 75 |

| | |
|---|-----|
| Figura 28: Níveis de fosforilação de substratos de PKA (A) e de fosforilação de AKT (B) de músculos EDL de ratos normais e diabéticos incubados na ausência e presença de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM (agonista de EPAC, 16,6 μ M)..... | 76 |
| Figura 29: Expressão de PDE4D em diferentes níveis de diferenciação da célula muscular (mioblastos e miotubos) e em músculos esqueléticos de camundongos (TA e FDB)..... | 77 |
| Figura 30: Expressão de PDE4D em cultura de mioblastos após transfecção com vetor controle ou diferentes SiRNA para PDE4D, após 24 e 48 horas. | 78 |
| Figura 31: Peso corporal médio de camundongos durante 10 dias, após a eletroporação de músculos com vetor e SiRNA para PDE4D. No dia 9, os animais do grupo jejuado foram submetidos ao jejum por 24 horas. | 79 |
| Figura 32: Massa de músculos TA (A) e FDB (B) eletroporados com vetor controle ou com SiRNA para PDE4D em animais alimentados ou submetidos ao jejum de 24 horas. | 80 |
| Figura 33: Área das fibras transfectadas com vetor controle ou SiRNA para PDE4D / área de fibras não transfectadas de músculos TA de animais alimentados ou submetidos ao jejum de 24 horas..... | 81 |
| Figura 34: Expressão gênica de PDE4D (A), LC3II (B) e p62 (C) em músculos FDB de animais alimentados ou submetidos ao jejum de 24 horas e após 10 dias da eletroporação com vetor controle ou com SiRNA para PDE4D. | 83 |
| Figura 35: Valores médios de peso corporal de ratos normais e ratos que receberam estreptozotocina nas doses de 40 a 100 mg/kg, durante 3 dias. | 124 |
| Figura 36: Valores médios de glicemia (mg/dL) de ratos normais e ratos que receberam estreptozotocina nas doses de 40 a 100 mg/kg..... | 126 |
| Figura 37: Valores médios de peso de músculos <i>soleus</i> (A) e EDL (B) (g) de ratos normais e ratos que receberam estreptozotocina nas doses de 40 a 100 mg/kg..... | 127 |
| Figura 38: Atividade quimiotripsina-like do proteassoma (nmol AMC/mg proteína/min) em músculos soleus e EDL de ratos normais e diabéticos tratados durante 3 dias com salina ou 1 mg/kg de rolipram (ROL)..... | 129 |
| Figura 39: Atividade quimiotripsina-like do proteassoma (nmol AMC/mg proteína/min) em músculos soleus e EDL de ratos normais e diabéticos tratados durante 3 dias com salina ou 2 mg/kg de rolipram (ROL)..... | 130 |
| Figura 40: Atividade quimiotripsina-like do proteassoma (nmol AMC/mg proteína/min) em músculos soleus e EDL de ratos normais e diabéticos tratados durante 3 dias com salina ou 5 mg/kg de rolipram (ROL)..... | 131 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| 4EBP1 | <i>Eucaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1;</i> |
| 5'AMP | 5'adenosina monofosfato; |
| 6-Bnz-cAMP-AM | <i>N6-benzoyladenosine-3',5'-cyclic monophosphate, acetoxymethyl ester;</i> |
| 8CPT-2Me-AMPC | 8-(p-clorofeniltio)-2'-o-metiladenosina-3',5'-monofosfato cíclico; |
| 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM | <i>para-chlorophenylthio-2'-O-methyladenosine-3',5'-cyclic monophosphate, acetoxymethyl ester;</i> |
| AIF | Fator de indução de apoptose; |
| AMC | 7-amino-4-metilcumarina; |
| AMPC | Adenosina 3,5-monofosfato cíclico; |
| Apaf | Fator de ativação de apoptose; |
| Atg | Genes relacionados à autofagia; |
| ATP | Adenosina trifosfato; |
| AUC | Área sobre a curva; |
| Beads | Microesferas de poliestireno; |
| Ca²⁺ | Cálcio; |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais; |
| CGRP | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; |
| CRCT2 | Co-regulador transcricional regulado por CREB; |
| CREB | <i>Camp response element-binding;</i> |
| E1 | Enzima ativadora de ubiquitina; |
| E2 | Enzima conjugadora de ubiquitina; |
| E3-ligase | Enzima ubiquitina-ligase; |
| EDL | <i>Extensor digitorum longus;</i> |
| EPAC | <i>Exchange protein directly activated by Camp;</i> |
| EPM | Erro padrão Médio; |
| FDB | <i>Flexor digitorum brevis;</i> |
| FoxO | <i>Forkhead box O;</i> |

| | |
|--------------------|---|
| GABARAP | <i>Gamma-aminobutyric acid receptor associated protein;</i> |
| GDP | Guanosina difosfato; |
| GIP | Peptídeo insulínico dependente de glicose; |
| GLUT | Transportador de glicose; |
| GTP | Guanosina trifosfato; |
| Gαβγ | Receptor acoplado a proteína G heterotrimérica; |
| HPRT | <i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase;</i> |
| HRP | <i>Horseradish</i> peroxidase; |
| <i>i.p.</i> | Via Intraperitoneal; |
| <i>i.v.</i> | Via Intravenosa; |
| IGF-1 | <i>Insulin growth factor 1;</i> |
| IL | Interleucina; |
| LB | <i>Lysogeny broth;</i> |
| LC3 | <i>Microtubule associated protein light chain 3;</i> |
| MAFBx | <i>Muscle atrophy f-box;</i> |
| Mtorc1 | <i>Mammalian target of rapamycin complex 1;</i> |
| MuRF-1 | <i>Muscle ring finger-1;</i> |
| N6BZ-AMPC | <i>N6-benzoyladenine-3',5'-cyclic monophosphate;</i> |
| NF-κB | Fator nuclear-κB; |
| PDE | Fosfodiesterase; |
| PE | Fosfatidiletanolamina; |
| PI(3)P | Fosfatidilinositol 3-fosfato; |
| PI3 quinase | Fosfatidilinositol-3 quinase; |
| PKA | Proteína quinase A; |
| PKB | Proteína quinase B; |
| PTX | Pentoxifilina; |
| ROL | Rolipram; |
| S.O.C. | <i>Super optimal broth;</i> |
| S6K1 | <i>Ribosomal protein S6 kinase beta 1;</i> |
| SiRNA | RNA de interferência; |
| SQSTM1 | Sequestrosoma 1; |

| | |
|--|---|
| STZ | Estreptozotocina; |
| TA | <i>Tibialis anterior</i> ; |
| TGF | <i>Transforming growth factor</i> ; |
| Tn | Troponina; |
| TNF-α | Fator de necrose tumoral α ; |
| TORC2 | <i>Transducer of regulated CREB protein 2</i> ; |
| TTGO | Teste de tolerância oral à glicose; |
| ULK | Unc-51-like quinase; |
| UPS | Sistema ubiquitina-proteassoma; |
| VPS | <i>Vacuolar protein sorting</i> ; |
| WIPI | <i>WD-repeat PI(3)P effector protein</i> ; |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrogênio; |
| β₂-AR | Receptores β ₂ -adrenérgicos; |

1. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é um dos maiores tecidos do corpo humano, compreendendo aproximadamente 40% da massa corporal total em um adulto não obeso (Marieb e Hoehn, 2010). O músculo esquelético é um tecido altamente adaptativo e pode sofrer hipertrofia ou atrofia em resposta a numerosos estímulos exógenos ou fatores biológicos, tais como estresse mecânico, desuso, idade ou desnutrição. Um aumento na carga mecânica (como por exemplo, treinamento de força de alta resistência) causa um aumento no tamanho e força musculares; inversamente, o desuso muscular (como por exemplo, imobilização induzida por lesão ou repouso no leito) resulta em fraqueza e atrofia musculares (Hopkins, 2006). Além disso, diversas vias metabólicas controlam o delicado equilíbrio entre os processos de síntese e degradação de proteínas (Schiaffino et al., 2007). Quando este equilíbrio é afetado, ocorre a instalação do quadro de atrofia da musculatura esquelética, caracterizado por diminuições na concentração de proteínas, no diâmetro da fibra, na produção de força e na resistência à fadiga (Glass e Roubenoff, 2010). É uma condição debilitante que ocorre durante condições fisiológicas ou patológicas, tais como jejum, desuso muscular, envelhecimento, câncer, diabetes mellitus, uremia e muitas outras doenças graves (Jagoe e Goldberg, 2001). Uma das principais consequências funcionais da atrofia é a fraqueza muscular, resultando em quedas, debilitação, incapacidade do trabalho e perda de vida independente. Além disso, a atrofia muscular afeta de forma significativa processos de recuperação e/ou piora do quadro de patologias, sendo diversas vezes associada ao risco aumentado de cirurgias, maior tempo de internação nos mais diversos quadros e menor resposta frente a intervenções quimioterápicas e radioterápicas em pacientes com câncer (MacDonald et al., 2003).

Os principais sistemas proteolíticos envolvidos no estabelecimento da atrofia muscular são o sistema ubiquitina-proteossoma (UPS) e o sistema autofágico-lisossomal (Sandri, 2008). Eventos envolvidos na ativação destes sistemas proteolíticos e que participam na patogênese da atrofia muscular incluem redução de efetores/sinalização anabólicos, aumento de efetores/sinalização catabólicos, estresse oxidativo, entre outros (Kandarian e Jackman, 2006; Sandri, 2008; Saini et al., 2009). Desta forma, diversos hormônios desempenham um papel importante no equilíbrio entre o anabolismo e o catabolismo proteico da musculatura esquelética; a testosterona, o hormônio do

crescimento, a insulina e o IGF-1 (*Insulin Growth Factor 1*) são hormônios anabólicos que induzem o crescimento muscular via aumento na velocidade de síntese proteica e/ou redução na velocidade de proteólise muscular. Por outro lado, os glicocorticoides, como o cortisol, e a miostatina (membro da superfamília *transforming growth factor* (TGF) - β) são fatores promotores do catabolismo, levando à atrofia muscular esquelética (Sheffield-Moore e Urban, 2004).

No entanto, a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da atrofia muscular é recente, justificando assim a falta de opções terapêuticas eficazes para o seu tratamento. Contudo, dentre os tratamentos já descritos e capazes de prevenir ou atenuarem a perda de massa muscular em condições catabólicas, destacam-se os agonistas β -adrenérgicos e a ativação da sinalização intracelular dependente do segundo mensageiro adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMPC).

Um dos estudos pioneiros que demonstrou o envolvimento do AMPC nas ações antiproteolíticas dos agonistas adrenérgicos foi realizado por Navegantes e colaboradores (2000), que observaram uma redução na velocidade de proteólise total em músculos esqueléticos de ratos incubados na presença de clenbuterol (agonista β_2 -adrenérgico) ou de dibutilil-AMPC (análogo do AMPC). Além disso, inibições tanto do sistema proteolítico dependente de cálcio (Navegantes et al., 2001) como também do UPS (Gonçalves et al., 2009) têm sido observadas na musculatura esquelética após intervenções farmacológicas que promovem aumentos nas concentrações de AMPC.

As concentrações intracelulares de AMPC são determinadas pelo balanço entre, *i*) a produção de AMPC por ação da adenilato ciclase (enzima ativada após a ligação de agonistas aos receptores adrenérgicos) e *ii*) a degradação de AMPC à 5'adenosina monofosfato (5'AMP) mediada por fosfodiesterases (PDE). A musculatura esquelética contém diversas isoformas de PDE, ressaltando a importância desta enzima na hidrólise de grande parte do AMPC neste tecido (Omori e Kotera, 2007; Shepherd et al., 2003).

Apesar de escassos, alguns estudos também têm demonstrado o papel de PDE no controle de processos proteolíticos e da massa muscular esquelética. Baviera et al. (2007) demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com pentoxifilina (PTX), um inibidor não-seletivo de PDE, foi capaz de promover um aumento no conteúdo de AMPC, redução na proteólise total em músculos EDL e redução na atividade do processo proteolítico dependente de cálcio e do UPS. Além disso, o tratamento com PTX promoveu uma redução nos níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral

α (TNF- α), corroborando as ações antiproteolíticas da PTX. No entanto, o efeito antiproteolítico da PTX também foi associado a uma ação direta do fármaco, uma vez que a incubação de músculos na presença de PTX *in vitro* também aumentou o conteúdo de AMPc e reduziu a participação do sistema proteolítico dependente de cálcio e do UPS (Baviera et al., 2007). Hinkle et al. (2005) observaram redução na perda de massa e de força musculares em animais desnervados ou castrados e tratados com inibidores de PDE 4, tais como rolipram (ROL) e Ariflo. Lira et al. (2011) também demonstraram que o controle da massa muscular esquelética pela PDE 4 parece depender de inibição da degradação proteica. Em conjunto, estes dados sugerem que inibidores de PDE possuem um potencial terapêutico interessante no tratamento de atrofia muscular.

A análise em conjunto destes achados corroboram opiniões apresentadas nos trabalhos de revisão de Berdeaux & Stewart (2012) e Joassard et al. (2013b), que descrevem a importância das respostas anabólicas desempenhadas pela sinalização dependente de AMPc sobre o metabolismo de proteínas na musculatura esquelética, e destacam a relevância de realização de estudos (que ainda são escassos) para a compreensão do papel dos intermediários ativados por este segundo mensageiro, com vistas à futura aplicação destes como alvos terapêuticos na prevenção e/ou tratamento de distrofias musculares e/ou atrofia muscular secundária a patologias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Músculo esquelético

A função da musculatura esquelética está relacionada principalmente à produção de força e manutenção de funções básicas do corpo, tais como locomoção, respiração, produção de calor e controle do metabolismo energético. Existem três tipos de músculos: esquelético, cardíaco e liso. Os músculos esqueléticos e cardíacos são referidos como músculos estriados devido à organização visível de unidades repetidas de filamentos contráteis, conhecidos como sarcômeros. Em contraste, os músculos lisos têm grandes quantidades de filamentos de actina e miosina que não possuem a complexa organização dos músculos estriados (Junqueira e Carneiro, 2004).

A miofibrila é constituída por dois tipos principais de proteínas, actina e miosina. O conjunto de actina e miosina formam o sarcômero, unidades que se repetem ao longo do comprimento das miofibrilhas, sendo delimitado entre duas linhas Z sucessivas (Junqueira e Carneiro, 2004). Entre as linhas Z, há uma banda A (filamentos de miosina) separando duas semibandas I (filamentos de actina) (McComas, 1996; Berne et al., 2004). Este arranjo altamente organizado de proteínas é responsável pelo processo de contração e força musculares.

Outras proteínas importantes desta maquinaria contrátil são a tropomiosina e as três moléculas de troponina (Tn); TnC, proteína de ligação ao cálcio (Ca^{2+}); TnI, unidade inibitória, com grande afinidade pela actina; e TnT, que se liga à tropomiosina, que participam do processo de contração muscular regulado pelo Ca^{2+} (Jones et al., 2004; Junqueira e Carneiro, 2004).

Cada célula muscular contém várias miofibrilhas paralelas, imersas no sarcoplasma e preenchem a fibra muscular em 80% do seu espaço. Dependendo do tipo muscular, podem existir de 50 ou até 2000 miofibrilhas por fibra muscular (McComas, 1996; Jones et al., 2004).

Cada músculo esquelético é constituído por uma mistura de fibras musculares, com características distintas, que podem ser classificadas como fibras de contração rápida ou lenta (Berne et al., 2004), ou de acordo com as propriedades metabólicas, em rápidas (glicolíticas) ou lentas (oxidativas). Além disso, há uma correlação entre a velocidade de contração e a atividade da ATPase da miosina, podendo ser classificadas

como tipo I, IIa ou IIb (Fitts, 1994). As fibras consideradas rápidas são do tipo II e as fibras lentas são do tipo I (Berne et al., 2004).

As fibras do tipo I (fibras lentas) possuem cor vermelho-escuro pois são ricas em mioglobina. Estas fibras também têm grandes quantidades de mitocôndrias e mionúcleos distribuídos pelo seu comprimento. É altamente vascularizada, para fornecer uma quantidade superior de oxigênio, e são fibras resistentes à fadiga, adaptadas às atividades de longa duração e manutenção postural. Já as fibras do tipo II (fibras rápidas), ao contrário das fibras do tipo I, contêm pouca mioglobina e são de cor vermelho claro. Possuem um diâmetro maior, para maior força de contração, e menor número de mionúcleos e mitocôndrias. São menos vascularizadas, mais possuem um extenso retículo sarcoplasmático, para uma liberação rápida dos ions Ca^{2+} . Estes tipos de fibras participam no movimento rápido e com intensidade (Kierszenbaum, 2004).

2.2. Turnover de proteínas

No tecido muscular, o metabolismo proteico é fortemente regulado por numerosos fatores, como por exemplo, fatores nutricionais, hormonais e neurais, na tentativa de manter o equilíbrio preciso entre os processos de síntese e de degradação de proteínas (Sakuma et al., 2017). Ambos os processos são intimamente relacionados: (i) durante a síntese proteica, proteínas que não foram corretamente enoveladas serão prontamente degradadas; (ii) a meia-vida das proteínas que é determinada pela atividade da maquinaria proteolítica; (iii) sistemas proteolíticos participam de maneira importante no *turnover* de proteínas sarcoméricas de músculos saudáveis e que foram modificadas por determinados eventos, tais como calor, função mecânica e estresse oxidativo (Sandri, 2008).

O músculo esquelético é composto por três frações de proteínas: proteínas miofibrilares (representam de 55-60% do total), proteínas sarcoplasmáticas (representam de 30-35% do total, e contêm a maior parte das enzimas metabólicas), e proteínas do estroma (representam de 10-15% do total, e são compostas por colágeno e proteínas da matriz extracelular) (Goll et al., 2008). O processo de renovação dessas frações proteicas no músculo estriado ocorre por mecanismos que dependem de suas complexidades e funções desempenhadas na estrutura muscular; proteínas do estroma, por exemplo, são degradadas por proteases extracelulares (Neti et al., 2009), as

proteínas sarcoplasmáticas são degradadas diretamente pelo proteassoma após a sua ubiquitinação, enquanto que as proteínas miofibrilares devem, primeiramente, ser dissociadas do arranjo na miofibrila, sem comprometer a função muscular, antes de serem marcadas para degradação pelo UPS ou o sistema autofágico-lisossomal (Goll et al., 2008). Já há evidências de que a dissociação das proteínas do sacomero é realizada pelos sistemas proteolíticos dependentes de calpaínas e de caspases.

2.3. Sistemas proteolíticos

Existem dois grandes sistemas proteolíticos nos músculos, o UPS e o sistema autofágico-lisossomal, ambos promovem a degradação de proteínas em pequenos peptídeos e/ou aminoácidos. Também são encontrados dois outros sistemas proteolíticos auxiliares neste tecido, mais limitados, devido à especificidade, que são o sistema proteolítico mediado por calpaínas ou por caspases (COSTELLI et al., 2005), cuja função é liberar as proteínas miofibrilares para a degradação por outros sistemas proteolíticos.

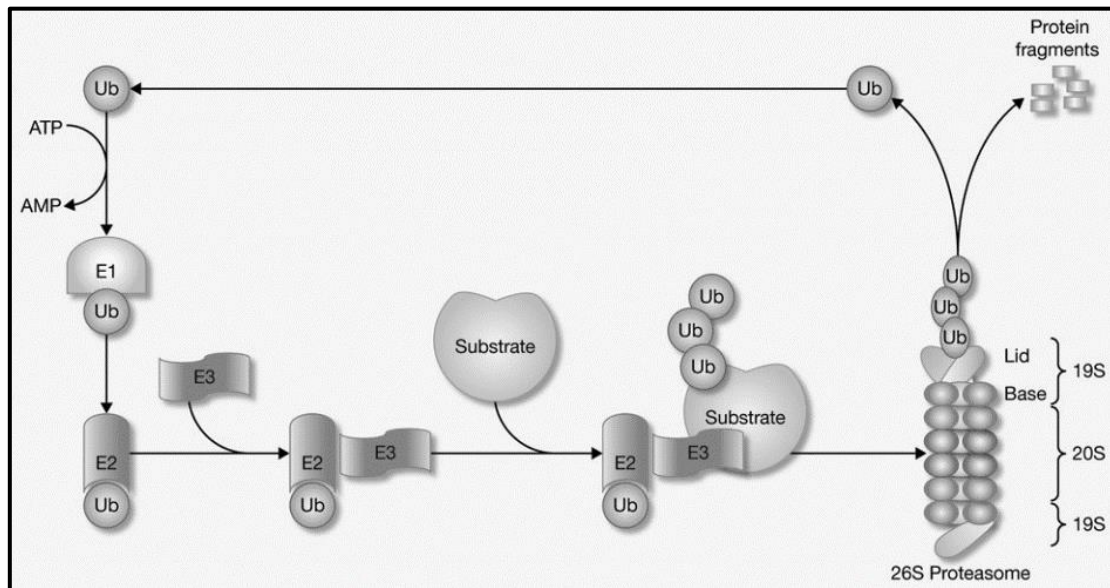
2.3.1. Sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (UPS)

O UPS apresenta duas etapas principais, *(i)* a ubiquitinação (marcação) de proteínas a serem degradadas, e *(ii)* o processo de degradação de proteínas marcadas em pequenos peptídeos ou aminoácidos, pelo proteassoma (Coux et al., 1996; Glickman e Ciechanover, 2002; Hedhli e Depre, 2010). Apesar do UPS ser um dos principais processos de degradação de proteínas, este é um sistema altamente seletivo, pois requer a marcação ou ubiquitinação prévia das proteínas a serem degradadas. A ubiquitinação consiste unicamente na ligação covalente entre moléculas de ubiquitina e a proteína alvo.

O processo de ubiquitinação é um complexo de reações químicas, as quais requerem a ação coordenada de três enzimas: a enzima ativadora de ubiquitina (E1), a enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e a enzima ubiquitina-ligase (E3), também conhecida simplesmente por E3-ligase. A ubiquitina é ligada à enzima E1 via uma reação dependente de energia. A molécula de ubiquitina é translocada para a E2, que substitui a E1, e finalmente, ao interagir com a E3 promove a transferência da molécula

de ubiquitina às proteínas específicas destinadas à degradação (Figura 1; Sandri, 2013). No músculo esquelético e cardíaco, existem duas E3-ligases específicas, atrogin-1 ou MAFbx (*muscle atrophy F-box*) e MuRF-1 (*muscle RING finger-1*) (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004).

Figura 1: Representação esquemática do sistema ubiquitina-proteassoma.



Rahimi, 2012

Após a ubiquitinação, a proteína poliubitinada é destinada à degradação mediada pela subunidade do proteassoma 26S. É importante ressaltar que o processo de ubiquitinação é reversível, uma vez que existem enzimas responsáveis pela remoção das ubiquitinas associadas à proteína, e esta regulação é realizada por subunidades presentes na partícula regulatória do proteassoma (Figura 1; Wilkinson, 2000).

A estrutura do proteassoma 26S é constituída por duas subunidades, a catalítica, ou proteassoma 20S, e a reguladora 19S. A subunidade 19S possui um importante papel na regulação da atividade do proteassoma, uma vez que apresenta em sua constituição subunidades capazes de reconhecerem as proteínas poliubiquitinadas e promover alterações conformacionais que permitem a entrada do substrato proteico ao centro catalítico (Etlinger e Goldberg, 1977; Hershko, 1996). A estrutura do proteassoma 20S, normalmente descrita como semelhante a um barril, é constituída por quatro anéis, sendo cada anel formado por sete subunidades de proteases. O proteassoma apresenta,

em seu complexo central, subunidades com sítios ativos de degradação, as quais exercem atividades do tipo caspase (hidrólise de aminoácidos ácidos), tripsina (hidrólise de aminoácidos básicos) e quimiotripsina (hidrólise de aminoácidos hidrofóbicos) (Wang et al., 2011).

2.3.2. Sistema proteolítico autofágico-lisossomal

Existem pelo menos três formas identificadas de autofagia: *i*) a autofagia mediada por chaperonas, *ii*) a microautofagia, e *iii*) a macroautofagia. Estas formas diferem quanto às funções fisiológicas e à maneira de transportar o material a ser degradado para o lisossomo (Mizushima e Komatsu, 2011).

Na autofagia mediada por chaperonas, as proteínas são reconhecidas por chaperonas e encaminhadas diretamente para o interior dos lisossomos por meio de transportadores específicos presentes na membrana lisossomal (Mizushima e Komatsu, 2011), enquanto que a microautofagia é o processo no qual a membrana lisossomal engloba pequenas porções do citoplasma por meio de invaginação, formando assim vesículas que são rapidamente degradadas pelas hidrolases lisossomais (Mizushima e Komatsu, 2011). Ambos os processos não exercem atividade significativa na musculatura esquelética (Sandri, 2011).

O processo autofágico mais estudado é a macroautofagia: consiste no englobamento de partículas citoplasmáticas por membranas lipídicas, formando uma vesícula, a qual é encaminhada para degradação nos lisossomos (Mizushima e Komatsu, 2011). A macroautofagia é essencial para a diferenciação celular, desenvolvimento e sobrevivência (Levine e Kroemer, 2008; Masiero et al. 2009; Grumati et al. 2011; He et al. 2012). A formação do autofagossomo é um processo complexo, extremamente dinâmico, envolvendo múltiplos complexos proteicos codificados por mais de 30 genes relacionados a autofágicos, os Atg (Feng et al., 2014; Klionsky et al., 2016; Bento et al., 2016; Morel, 2017).

O primeiro complexo proteico de Atg formado é denominado *Unc-51-like* quinase 1/2 (ULK 1/2), que ocorre através da inativação do complexo proteico *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1). Uma vez ativado, o complexo ULK 1/2 é responsável pela ativação de fosfatidilinositol 3-quinase de classe III (PI3-quinase), ou *vacuolar protein sorting* (VPS) 34, composto pela PI3-quinase denominada

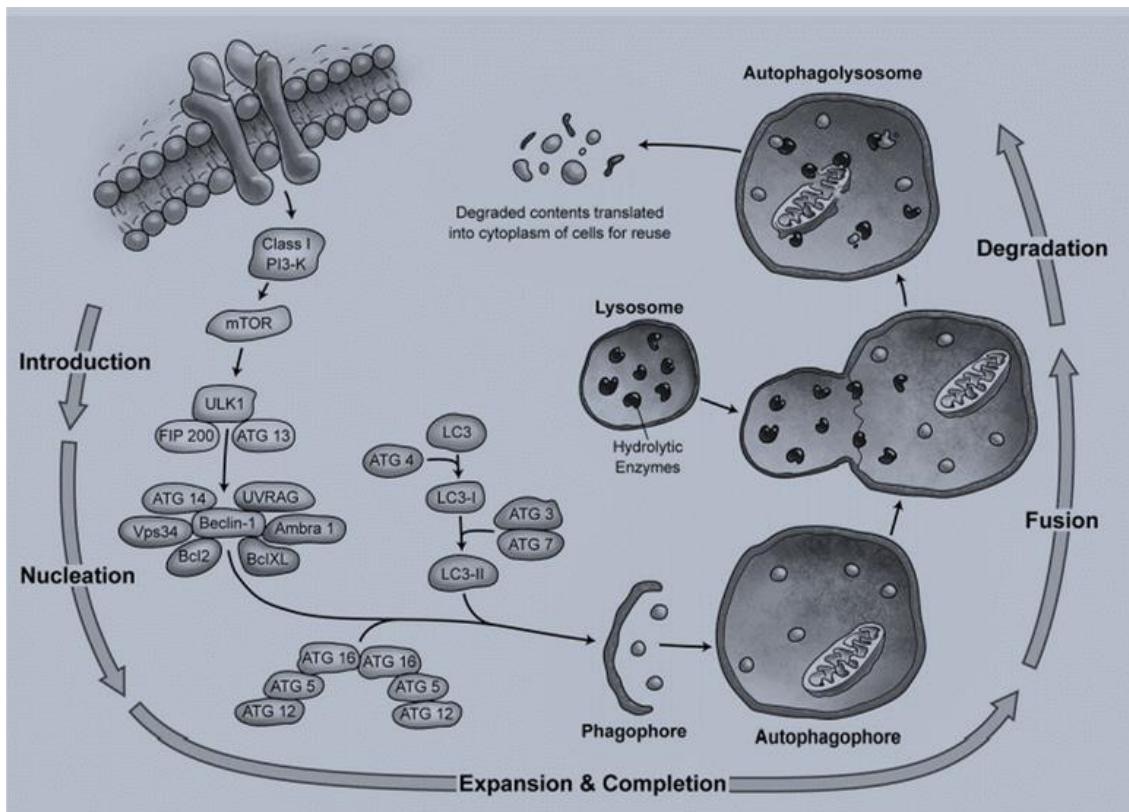
PIK3C3 (VPS34 em levedura), VPS15, VPS30, Atg14 e Beclin-1 (Molejon et al., 2013). O complexo PI3K de classe III transloca-se para os sítios do retículo endoplasmático e produz um *pool* de fosfatidilinositol 3-fosfato [PI(3)P]; a geração de PI(3)P na membrana do fagóforo (precursor do autofagossomo) é crucial para o recrutamento de fatores essenciais para a formação do autofagossomo, incluindo o WIPI (*WD-repeat PI(3)P effector protein*, Atg18 em levedura) (Marat e Haucke, 2016). Foi demonstrado que as proteínas WIPI 1 e 2 são responsáveis pelo recrutamento do complexo Atg12-Atg5-Atg16L1 no fagóforo nascente, resultando em lipidação e alongamento da membrana pré-autofagossômica (Proikas-Cezanne et al., 2015).

Duas conjugações semelhantes à ubiquitinação estão envolvidas no alongamento das estruturas pré-autofagossomais (Ravikumar et al., 2010; Mizushima et al., 2011). O primeiro sistema tipo ubiquitina tem como componente a proteína Atg12, uma proteína semelhante à ubiquitina, que é covalentemente acoplada à Atg5 pela ação de enzimas semelhantes a E1 e E2 (Atg7 e Atg10, respectivamente). O Atg12-Atg5 é complexado com Atg16L1, formando o complexo Atg12-Atg5-Atg16L1, este se associa à membrana externa do fagóforo através das proteínas WIPI. O complexo Atg12-Atg5-Atg16L1 alonga-se independentemente, embora seja auxiliar ao segundo sistema tipo ubiquitina. Neste segundo sistema, Atg7 atua como um E1, envolvendo a proteína do tipo ubiquitina, LC3 (*microtubule associated protein light chain 3*) e proteínas relacionadas, como GABARAP (*Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*) e GATE-16. Estas proteínas são clivadas por Atg4, resultando na isoforma citoplasmática LC3-I, que é conjugada com fosfatidiletanolamina (PE) e em uma reação envolvendo Atg7 (semelhante a E1) e Atg3 (semelhante a E2), forma LC3-II. O complexo Atg12-Atg5-Atg16L atua como uma enzima semelhante a E3, direcionando a LC3-II formada na membrana do fagóforo (Kabeya et al., 2000; Abounit et al., 2012). A LC3-II é frequentemente usada como um marcador para o autofagossomo e como um índice de autofagia (Figura 2).

A fusão dos autofagossomos com os lisossomos resulta na formação de autolisossomos, dentro dos quais as proteínas englobadas são degradadas pelas hidrolases, e seus produtos de degradação são liberados no citoplasma para uso em futuras reações anabólicas (Ravikumar et al., 2010; Molejon et al., 2013; Bento et al., 2016). Deve ser enfatizado que a autofagia e o UPS estão funcionalmente interligados. A proteína p62, também chamada sequestosoma 1 (SQSTM1), tem um papel importante

na mediação da relação entre estas duas vias proteolíticas; A p62/SQSTM1 possui domínios específicos de interação com proteínas poliubiquitinadas e com o proteossoma ou LC3-II, direcionando proteínas poliubiquitinadas para ambas as vias proteolíticas (Myeku e Figueiredo-Pereira, 2011).

Figura 2: Representação esquemática da via autofágica-lisossomal.



Marzban et al., 2015

2.3.3. Sistema proteolítico dependente de calpaínas

O sistema dependente de calpaínas constitui uma via de degradação de proteínas em células eucarióticas composta de duas classes de proteínas, calpaínas e calpastatina. As calpaínas, μ -calpaína e m-calpaína, são cisteína-proteases não lisossomais dependentes de cálcio. Estas proteases possuem um inibidor fisiológico, a calpastatina, que regula suas atividades (Powers et al, 2005; Goll et al., 2008). As calpaínas agem sobre um número limitado de substratos proteicos e não são capazes de degradarem

proteínas completamente, bem como não catalizam a degradação do complexo de proteínas sarcoplasmáticas. Ao invés disso, elas fazem poucas clivagens seletivas, levando à formação de grandes fragmentos proteicos.

Apesar de não degradarem diretamente as proteínas contráteis do músculo, as calpaínas clivam as proteínas que ancoram o complexo actina-miosina, liberando os componentes proteicos do sarcômero para serem degradados por outros sistemas proteolíticos (Koh e Tidball, 2000; Purintrapiban et al, 2003). Dentre os substratos das calpaínas, podemos citar a titina, a nebulina, a desmina e a filamina (proteínas que ancoram o sarcômero) (Goll et al., 1991; Goll et al., 2003), além da troponina e da tropomiosina (Goll et al., 1992; Goll et al., 2003), o que propiciaria a liberação do complexo actina-miosina. Assim, o papel das calpaínas no *turnover* das proteínas miofibrilares parece estar restrito à liberação de actina e miosina das miofibrilas (Kemp et al., 2013; Smith e Dodd, 2007).

2.3.4. Sistema proteolítico dependente de caspases

A proteólise mediada por caspases tem sido associada aos processos de apoptose, os quais são vitais durante o desenvolvimento de organismos multicelulares. Em relação ao envolvimento nos processos de apoptose, estas proteases são sintetizadas como precursores inativos (pró-caspases) e são ativadas somente quando a célula recebe sinal de morte (Haanen e Vermes, 1996; Spanos et al., 2002). Sinais extrínsecos e intrínsecos podem desencadear toda a sequência de eventos da programação de morte celular, tais como ativação da sinalização do TNF- α , aumento na geração de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, alteração na composição de proteínas da família pró- e anti-apoptóticas, desequilíbrio na homeostasia intracelular do Ca²⁺, entre outros (Primeau et al., 2002; Spanos et al., 2002; Jeong et al., 2005). Todos estes sinais levam à ativação diferencial de respostas celulares que ocorrem principalmente no citoplasma, núcleo e mitocôndria, todas envolvidas com a ativação das caspases.

A via extrínseca de ativação de caspases é iniciada por sinais externos à célula, tais como radicais livres, agentes químicos ou físicos, que vão estimular os receptores da superfície celular, como Fas ligante e TNF. Com a ativação de receptores de membrana, caspases iniciais (8 e 10) são autoativadas (Chang e Yang, 2000; Grutter, 2000) e estas caspases irão atuar na ativação da caspase-3, esta executora da apoptose.

A via intrínscica pode ser decorrente do estresse celular, com ou sem lesões do DNA, que levará a alterações morfofuncionais da mitocôndria com liberação de citocromo c que, acoplado ao fator de ativação de apoptose (Apaf), irá ativar a pró-caspase 9, formando o complexo apoptossômico, responsável pela ativação da caspase 9 e esta ativará a pró-caspase-3 (Chang e Yang, 2000; Grutter, 2000). O fator de indução de apoptose (AIF) e a proteína Diablo são outros fatores mitocondriais que também ativam a apoptose (Schultz et al., 2000).

Vale ressaltar que o balanço entre as proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w, A1), localizadas no envelope nuclear e no retículo endoplasmático, e as proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bid, Bcl-xS, Bak, Box, Bik, Blk, Bim, HrK, BNIP3), localizadas principalmente na membrana externa da mitocôndria, determina se a célula entrará ou não em apoptose (Betts e King, 2001; Spanos et al., 2002). Estas proteínas estão ligadas às mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial, porém também podem estar envolvidas na ativação das caspases. A proteína Bcl-2 inibe a apoptose de forma direta (bloqueando as caspases) ou indireta (impedindo a liberação do citocromo c) (Haanen; Vermes, 1996; Spanos et al., 2002).

O papel do processo apoptótico na degradação de proteínas na musculatura esquelética já foi evidenciado em diversos estudos que demonstraram que caspase-3 é capaz de liberar proteínas do sarcômero, através da clivagem de complexos de actomiosina, que são sequencialmente destinados ao UPS. Em conjunto, nota-se que caspases e calpaínas compartilham papéis importantes na oferta de substratos aos sistemas proteolíticos na musculatura esquelética (Jackman e Kandarian, 2004).

2.4. Atrofia muscular

Embora a proteólise seja fundamental para a homeostase do músculo esquelético e seu desenvolvimento (Bell et al., 2016), é consenso o fato de que a excessiva degradação de proteínas é determinante para a perda de massa muscular e instalação do quadro de atrofia. A atrofia é uma condição caracterizada por uma diminuição visível do tamanho e/ou do número das miofibrilhas, bem como uma diminuição na velocidade de síntese e/ou um aumento na velocidade de degradação proteica (Berne et al., 2004; Jackman e Kandarian, 2004).

Tem sido relatado que o aumento na velocidade de degradação de proteínas, culminando em acentuada perda de massa muscular, pode ocorrer em uma variedade de condições patológicas: (i) doenças crônicas, tais como câncer, diabetes mellitus, insuficiência cardíaca crônica, doença renal crônica, doença pulmonar obstrutiva, síndrome da imunodeficiência adquirida, síndrome de Cushing, distrofias músculo-esqueléticas, entre outros, levando à caquexia; (ii) condições de desuso, tais como desnervação e imobilização, levando à atrofia muscular; (iii) sarcopenia (Dutt et al., 2015; Cohen et al., 2015). Uma ampla gama de distúrbios é observada em pacientes com perda progressiva de massa muscular esquelética, tais como diminuição da força muscular, provocando redução na atividade funcional e na capacidade de realização de exercícios físicos, bem como um maior risco de perdas ósseas e fraturas, que em conjunto contribuem para a redução na qualidade de vida e aumento da morbidade e mortalidade (Cohen et al., 2015).

2.5. Agonistas β -adrenérgicos

Os recentes avanços no conhecimento acerca dos mecanismos que controlam o metabolismo de proteínas na musculatura esquelética têm permitido a compreensão das bases fisiopatológicas que levam à perda de massa muscular durante condições atroficas, contribuindo assim para a prospecção de novas possibilidades terapêuticas para o tratamento de quadros de perda de massa muscular (Dutt et al., 2015; Cohen et al., 2015).

Nos últimos anos, é crescente o interesse na compreensão do papel da sinalização adrenérgica no controle do metabolismo de proteínas na musculatura esquelética (Lynch e Ryall, 2008). Um grande número de estudos tem demonstrado que a estimulação de receptores β -adrenérgicos com agonistas específicos (β -agonistas) é capaz de promover ações anabólicas na musculatura esquelética, aumentando a massa muscular. Por este motivo, o potencial anabólico dos β -agonistas tem sido amplamente explorado, no sentido de delinear novas opções terapêuticas que possam ser utilizadas para atenuar ou até mesmo reverter a perda de massa muscular observada em diversas condições, tais como sarcopenia, distrofias e quadros de caquexia secundária a patologias (Koopman et al., 2009).

Na musculatura esquelética são identificadas três isoformas de receptores β -adrenérgicos: β_1 , β_2 e β_3 , com prevalência dos receptores β_2 -adrenérgicos, β_2 -AR (Kim et al., 1991). A estimulação de β_2 -AR na musculatura esquelética com determinados agonistas (formoterol, clenbuterol, salbutamol) tem sido associada à redução na perda de massa muscular em diversos quadros catabólicos, tais como desnervação (Gonçalves et al., 2012), sarcopenia (Conte et al., 2012), caquexia devido ao câncer (Costelli et al., 1995), atrofia muscular espinhal (Tsai, 2012), dentre outros. Já a administração do β_2 -agonista formoterol a ratos normais, sem atrofia, promove hipertrofia muscular (Joassard et al., 2013a). Apesar de muitos estudos ainda serem necessários nesta área, é consenso na literatura que as ações anabólicas de β_2 -agonistas na musculatura esquelética estão associadas a um aumento na velocidade de síntese proteica, a uma diminuição na velocidade de degradação proteica, ou uma combinação de ambos.

Apesar da grande quantidade de estudos demonstrando os benefícios de β_2 -agonistas na prevenção/reversão/atenuação de quadros atroficos, condição que poderia colocá-los como agentes promissores no tratamento de perdas de massa muscular, inúmeras desvantagens e até mesmo eventos adversos são observados com o uso destes fármacos, especialmente por longos períodos. Considerando a presença de β_2 -AR em outros tecidos (musculatura cardíaca, pulmões, tecido adiposo, fígado), a administração sistêmica de β_2 -agonistas deve ser analisada levando-se em consideração seus efeitos não somente na musculatura esquelética. Assim, ao uso de β_2 -agonistas têm sido atribuídos alguns efeitos adversos, tais como taquicardia, arritmias, vasodilatação periférica, hiperglicemia, hipocalcemia, insônia, náuseas, dentre outros (Ryall e Lynch, 2008). Por este motivo, a compreensão dos mecanismos intracelulares envolvidos no controle do metabolismo de proteínas na musculatura esquelética por ação de β -agonistas pode ser importante para o encontro de alvos mais específicos e/ou menos prejudiciais no tratamento da perda de massa muscular.

Os eventos intracelulares controlados por β_2 -agonistas nos tecidos, incluindo a musculatura esquelética, iniciam-se após a sua ligação aos receptores específicos localizados na membrana plasmática. Os β_2 -AR pertencem à classe dos receptores acoplados à proteína G heterotrimérica ($G\alpha\beta\gamma$). Após a estimulação dos β_2 -AR, ocorrem mudanças conformacionais nos *loops* intracelulares do receptor, que levam à ativação da proteína G (isto é, liberação do nucleotídeo guanosina difosfato, GDP, da subunidade $G\alpha$ estimulatória, $G\alpha_s$, e ligação do nucleotídeo guanosina trifosfato,

GTP); assim, ocorre ativação de G α s e exposição de sítios de interação em G $\beta\gamma$. A subunidade G α s é capaz de ativar a enzima adenilato ciclase que, a partir do nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP), promove a síntese do segundo mensageiro AMPc.

Uma série de evidências tem demonstrado que o AMPc participa do mecanismo através do qual a sinalização de β_2 -AR exerce efeitos anabólicos no metabolismo de proteínas, incluindo a inibição da degradação de proteínas musculares. Navegantes et al. (2000) observaram que músculos incubados *in vitro* com clenbuterol (β_2 -agonista) ou dibutilil-AMPc (análogo do AMPc) apresentaram redução na velocidade de proteólise total. Estudos posteriores demonstraram que a queda na velocidade de proteólise total mediada pelo aumento do AMPc pode ser consequência, pelo menos em parte, de inibição tanto do sistema proteolítico dependente de cálcio (Navegantes et al., 2001) quanto do sistema ubiquitina-proteassoma, o UPS (Gonçalves et al., 2009).

2.6. Inibidores de fosfodiesterases

Considerando serem as concentrações intracelulares de AMPc determinadas pelo balanço entre a produção de AMPc pela adenilato ciclase e a sua degradação mediada por PDE (convertem AMPc em 5'AMP), o uso de inibidores de PDE na promoção de aumentos nos níveis de AMPc e assim subsequente inibição na velocidade de degradação proteica muscular pode ser uma opção interessante para atenuar a perda de massa muscular. A musculatura esquelética contém diversas isoformas de PDE, especialmente as PDE dos tipos 4, 7 e 11 (Omori e Kotera, 2007); no entanto, a PDE 4 perfaz 80% do total, contribuindo assim para a hidrólise de grande parte do AMPc neste tecido (Shepherd et al., 2003).

Recentemente, revisões que têm como objetivo: (i) apresentar opções terapêuticas promissoras para o tratamento de atrofia muscular e/ou (ii) compreender os mecanismos através dos quais a sinalização dependente de AMPc pode ser utilizada para atenuar a perda de massa muscular em condições patológicas, ressaltam a importância de trabalhos que investigaram as ações antiproteolíticas de inibidores de PDE, em diversos quadros onde ocorre a perda de massa muscular (Ryall e Lynch, 2008; Berdeaux e Stewart, 2012; Joassard et al., 2013b; Dutt et al., 2015).

Dentre os inibidores não-seletivos de PDE capazes de reduzirem a degradação de proteínas na musculatura esquelética em condições catabólicas, merecem destaque a

PTX e a torbafilina. Baviera et al. (2007) demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com PTX foi capaz de promover aumento no conteúdo de AMPc, redução na proteólise total em músculos EDL e redução na atividade do processo proteolítico dependente de calpaínas e do UPS. Joshi et al. (2014) fizeram observações semelhantes quando ratos em quadro de catabolismo proteico promovido por queimadura foram tratados com torbafilina, também em músculos EDL, com aumento no conteúdo de AMPc, redução na proteólise total e na expressão de componentes dos sistemas proteolíticos lisossomal e UPS. Outros estudos também descreveram as ações antiproteolíticas de inibidores não específicos de PDE em músculos esqueléticos (Breuillé et al., 1993; Combaret et al., 1999; Navegantes et al., 2000; Lira et al., 2007), com abordagens tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

No entanto, já são mais escassos os estudos que investigaram as ações antiproteolíticas de inibidores de PDE 4 na musculatura esquelética. Hinkle et al. (2005) observaram redução na perda de massa e de força musculares em animais desnervados ou castrados e tratados com inibidores de PDE 4, tais como ROL e Ariflo. Lira et al. (2011) demonstraram que músculos EDL isolados de ratos normais e incubados *in vitro* na presença de ROL apresentaram aumento no conteúdo de AMPc e redução na proteólise total. Neste trabalho, a importância do envolvimento de PDE 4 na inibição da degradação proteica muscular fica ainda mais evidente, uma vez que os níveis de AMPc não foram alterados em músculos incubados na presença de dipiridamol (inibidor de PDE tipo 5) ou amrinona (inibidor de PDE tipo 3).

2.7. Sinalização intracelular dependente de AMPc

O AMPc é um segundo mensageiro capaz de modular diversos processos celulares, via ativação de duas proteínas: (i) proteína quinase A (PKA) e (ii) *exchange protein directly activated by cAMP* (EPAC). Com o aumento nas concentrações de AMPc, ocorre a ligação deste nas subunidades regulatórias de PKA, promovendo a dissociação das subunidades catalíticas, que irão fosforilar diferentes proteínas alvo. Dentre as ações de PKA, destacam-se a ativação de fatores de transcrição, incluindo *cAMP response element-binding protein*, CREB; promoção de abertura de canais iônicos; ativação e/ou dessensibilização de receptores acoplados à proteína G (Paradiso e Brehm, 1998, Ptacek et al., 2005; Santangelo, 2006; Milligan e Kostenis, 2006).

O envolvimento de PKA no controle da proteólise muscular, levando à redução da degradação proteica e consequente modulação da massa muscular em condições catabólicas, tem recebido grande destaque (Navegantes et al., 2006; Gonçalves et al., 2012; Silveira et al., 2014). Foi demonstrado que o tratamento com clenbuterol e a subsequente elevação no conteúdo de AMPc, suprimiu a expressão de MuRF-1, atrogin-1 e catepsina L em músculos EDL de animais denervados (Gonçalves et al., 2012). Os autores atribuíram este efeito à ativação da via de sinalização AMPc/PKA, uma vez que músculos incubados com *N6-benzoyladenosine-3',5'-cyclic monophosphate* (N6BZ-AMPc), um agonista seletivo de PKA, apresentaram respostas semelhantes ao tratamento com clenbuterol (Gonçalves et al., 2012). Silveira et al. (2014) também demonstraram que ratos submetidos à simpatectomia lombar apresentaram aumentos na atividade da adenilato ciclase e no conteúdo de AMPc em músculos EDL, e em paralelo, houve diminuição na atividade proteolítica do UPS. Os autores também observaram que músculos EDL de ratos normais incubados com noradrenalina apresentaram aumentos nos níveis de AMPc e na fosforilação de CREB e *Forkhead box O* (FoxO) 1, bem como redução no RNAm de atrogin-1 e MuRF-1. Efeitos semelhantes foram observados em células C2C12 incubadas com forskolina, um ativador da adenilato ciclase, e em músculos EDL incubados com N6BZ-AMPc. Assim os autores sugeriram que os efeitos supressores da noradrenalina sobre a atividade do UPS e expressão dos atrogenes possam ser mediados pela sinalização AMPc/PKA.

Por outro lado, a proteína EPAC, que também é ativada pelo AMPc e de maneira independente da ativação de PKA, também tem sido alvo de estudos nos últimos tempos. Existem duas isoformas de EPAC; a EPAC 1 é expressa em praticamente todos os tecidos, inclusive na musculatura esquelética, já a EPAC 2 é expressa somente em cérebro, fígado, pâncreas e glândula adrenal (Kawasaki et al., 1998; De Rooij et al., 1998). Ambas as isoformas atuam ativando os mesmos intermediários, as GTPases pequenas Rap 1 e Rap 2, porém as funções celulares controladas são distintas e intimamente ligadas ao tipo de tecido onde estão localizadas (Schmidt et al., 2013). Cresce a cada dia o interesse na compreensão do papel de EPAC no controle das funções dependentes de AMPc (Borland et al., 2009; Almahariq et al., 2013).

Sobre a possível participação de EPAC no controle da degradação de proteínas musculares, Baviera et al. (2010) demonstraram que músculos EDL incubados *in vitro*

na presença de 8-(p-clorofeniltio)-2'-O-metiladenosina-3',5'-monofosfato cíclico (8CPT-2Me-AMPC, agonista seletivo de EPAC) apresentaram redução na proteólise total; também houve aumento nos níveis de fosforilação de AKT ou PKB, proteína quinase B, e do fator de transcrição FoxO3a. Uma vez fosforilada e ativada, a AKT promove fosforilação dos fatores de transcrição FoxO1 e FoxO3a, que são exportados do núcleo para o citoplasma, e assim ocorre inibição da transcrição dos atrogênes, especialmente atrogin-1 e MuRF-1 (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004). A supressão da expressão destes genes que expressam para proteínas do tipo E3 ubiquitina ligases previne a ativação de UPS e conseqüentemente ocorre inibição da perda de massa muscular.

Desta maneira, sabendo do potencial da sinalização dependente de AMPc no controle do metabolismo proteico e a importância da elucidação de novos alvos como estratégias terapêuticas mais específicas e eficazes para a atenuação de quadros de atrofia muscular, este trabalho busca avaliar o papel de PDE, via inibição farmacológica com PTX (inibidor não-seletivo) ou ROL (inibidor seletivo de PDE4), no controle dos processos proteolíticos dependentes de caspases, calpaínas e UPS em músculos esqueléticos de animais diabéticos. Por fim, via silenciamento gênico de PDE4D, foi estudado o papel de PDE4D no controle do processo autofágico-lisossomal em músculos esqueléticos de animais jejuados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o papel de inibidores de fosfodiesterases (pentoxifilina e rolipram) no controle da degradação de proteínas na musculatura esquelética de ratos em situação de atrofia muscular promovida pelo diabetes estreptozotocínico, com enfoque principal na regulação dos processos proteolíticos mediado por caspases, calpaínas e sistema ubiquitina-proteassoma, e participação de efetores intracelulares ativados por AMPc nesta regulação, além de avaliar o papel da fosfodiesterase PDE4D no controle do processo autofágico-lisossomal.

3.2. Objetivos específicos

Em músculos esqueléticos *soleus* e EDL de ratos normais e diabéticos tratados com inibidores de fosfodiesterases, avaliar:

- ❖ As atividades das proteases intracelulares, caspase-3, calpaínas e proteassoma;
- ❖ As alterações nos níveis proteicos de MuRF-1, atrogin-1 e conjugados poliubiquitinados;
- ❖ As alterações nos níveis proteicos de componentes do sistema proteolítico mediado por calpaínas, m-calpaína e calpastatina;
- ❖ As alterações nos níveis proteicos dos componentes do processo proteolítico mediado por caspase-3, Bax, Bcl-2 e caspase-3;
- ❖ As alterações no conteúdo de AMP cíclico;
- ❖ As alterações nos níveis proteicos e/ou níveis de fosforilação dos efetores intracelulares ou fatores de transcrição: PKA, CREB, FoxO1/FoxO3a, EPAC e AKT.

Em músculos esqueléticos *soleus* e EDL, de ratos normais e diabéticos incubados na presença de rolipram, *N6-benzoyladenosine-3'5'-cyclic monophosphate, acetoxymethyl ester* (6-Bnz-cAMP-AM, agonista de PKA) ou *para-chlorophenylthio-*

2'-O-methyladenosine-3'5'cyclic monophosphate, acetoxymethyl ester (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM, agonista de EPAC), avaliar:

- ❖ As alterações nos níveis proteicos e níveis de fosforilação dos substratos de PKA e AKT;
- ❖ As alterações na velocidade de proteólise total (rolipram).

Em músculos esqueléticos de camundongos alimentados ou submetidos ao jejum de 24 horas, que foram silenciados para expressão de PDE4D, avaliar:

- ❖ A preservação da massa muscular (*tibialis anterior* e *flexor digitorum longus*);
- ❖ A área das fibras musculares (*tibialis anterior*);
- ❖ As alterações na expressão de proteínas do sistema autofágico-lisossomal, LC3, p62 (*flexor digitorum longus*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Experimento I: Efeito do tratamento de ratos diabéticos com inibidores de fosfodiesterases (pentoxifilina ou rolipram) no controle do metabolismo proteico na musculatura esquelética

4.1.1. Desenho experimental

Ratos machos da linhagem Wistar (80-90 g; 4 semanas), provenientes do Biotério Central de Botucatu, UNESP, foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Análises Clínicas, FCFAr/UNESP, recebendo dieta comercial e água *ad libitum* e mantidos em ciclo luz-escuro de 12 horas, temperatura de 23°C e umidade de 55%. Os animais permaneceram nestas condições por no mínimo 48 horas antes dos experimentos. Todos os procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, FCFAr/UNESP (CEUA/FCF/CAr nº 39/2012, Anexo I).

Inicialmente foi realizada a padronização do modelo de diabetes mellitus experimental a fim de encontrar a menor dose efetiva de estreptozotocina (STZ) para instalação do diabetes mellitus (Anexo II).

Os animais foram mantidos em jejum de 12 horas antes da indução do diabetes mellitus experimental. Diferentes doses de STZ foram estudadas (40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 e 135 mg STZ/kg), solubilizadas em tampão citrato 10 mM (pH 4,5), e administradas por via intravenosa (*i.v.*, veia jugular), acessada após anestesia dos ratos com isoflurano. Animais normais, não-diabéticos, receberam somente tampão citrato, pela mesma via. Grupos de animais normais e diabéticos que receberam as diferentes doses de STZ foram pesados diariamente para monitoramento do ganho de peso corporal. Três dias após a administração de STZ, os animais foram eutanasiados por decapitação, o sangue coletado para determinação da glicemia e os músculos *soleus* e EDL foram removidos e pesados.

Estabelecida a dose de 60 mg/kg de STZ como a efetiva na promoção do modelo de atrofia muscular devido à deficiência insulínica, a segunda padronização tratou da seleção da dose efetiva de rolipram, inibidor específico PDE 4 (ANEXO III). A

literatura reporta tratamentos de animais com rolipram em doses que se encontram no intervalo de 1 a 5 mg/kg. Assim, estudamos as doses de 1, 2 e 5 mg/kg de rolipram, doses estas que seriam capazes de promover inibição da atividade proteolítica na musculatura de ratos diabéticos. Para tal investigação, foram analisadas as consequências do diabetes mellitus experimental (3 dias pós-STZ) e do tratamento de animais com rolipram (3 dias de tratamento) na atividade quimiotripsina-*like* do proteassoma, uma vez que a atividade do proteassoma é uma das grandes responsáveis pelo estabelecimento de atrofia na musculatura esquelética de animais diabéticos (Pepato et al., 1996; Baviera et al., 2007).

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- ❖ Grupo normal, não-diabético, tratado com salina (NS);
- ❖ Grupo normal, não-diabético, tratado com 1 mg/kg de rolipram (NROL1);
- ❖ Grupo normal, não-diabético, tratado com 2 mg/kg de rolipram (NROL2);
- ❖ Grupo normal, não-diabético, tratado com 5 mg/kg de rolipram (NROL5);
- ❖ Grupo diabético, tratado com salina (DS);
- ❖ Grupo diabético, tratado com 1 mg/kg de rolipram (DROL1);
- ❖ Grupo diabético, tratado com 2 mg/kg de rolipram (DROL2);
- ❖ Grupo diabético, tratado com 5 mg/kg de rolipram (DROL5).

O rolipram foi administrado nas doses citadas após solubilização em salina, por via intraperitoneal (*i.p.*), no dia seguinte à indução do diabetes, uma vez ao dia (entre 8-9 horas da manhã), durante 3 dias. Os animais foram pesados diariamente, para monitoramento do ganho de peso corporal. Três dias após a indução do diabetes mellitus e tratamento com rolipram, os animais foram eutanasiados por decapitação, o sangue coletado para a determinação da glicemia e os músculos *soleus* e EDL foram removidos e pesados. Músculos de uma das patas foram imediatamente processados para a determinação da atividade do proteassoma.

Após a padronização das doses de STZ e de rolipram, foram realizados os experimentos definitivos. O diabetes mellitus experimental foi induzido tal como

descrito anteriormente e no dia seguinte, os animais foram separados nos grupos experimentais:

- ❖ Grupo normal, não-diabético, tratado com salina (NS);
- ❖ Grupo normal, não-diabético, tratado com 25 mg/kg de pentoxifilina (NPTX);
- ❖ Grupo normal, não-diabético, tratado com 2 mg/kg de rolipram (NROL);
- ❖ Grupo diabético, tratado com salina (DS);
- ❖ Grupo diabético, tratado com 25 mg/kg de pentoxifilina (DPTX);
- ❖ Grupo diabético, tratado com 2 mg/kg de rolipram (DROL).

Os inibidores de fosfodiesterases (pentoxifilina e rolipram) foram administrados após solubilização em salina, por via intraperitoneal, no dia seguinte à indução do diabetes mellitus experimental, uma vez ao dia, durante 3 dias. Os animais foram pesados diariamente, para monitoramento do ganho de peso corporal.

Três dias após a indução do diabetes mellitus e dos tratamentos com pentoxifilina ou rolipram, os animais foram eutanasiados por decapitação, o sangue foi coletado em tubos com e sem heparina (Hemofol[®]), para obtenção do plasma e soro, respectivamente. O plasma foi utilizado para a determinação da glicemia e o soro para a determinação de insulina e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β). Músculos *soleus* e EDL foram removidos e pesados; os músculos utilizados para a determinação das atividades proteolíticas (proteassoma, caspase-3 e calpaínas) foram imediatamente processados, e os músculos utilizados para a determinação do conteúdo de AMPc ou alterações nos níveis proteicos e/ou níveis de fosforilação de diversos componentes foram mantidos em nitrogênio líquido até seu armazenamento em *freezer* -80°C, para posterior utilização.

4.1.2. Teste de tolerância oral à glicose (TTGO)

Após a obtenção e análise dos resultados de glicemia e níveis de insulina sérica de animais diabéticos tratados com 2 mg/kg de rolipram, foram investigadas as ações do rolipram no controle glicêmico de ratos normais e diabéticos via realização de TTGO.

Os animais foram tratados tal como descrito anteriormente e, no segundo dia de tratamento, os animais foram mantidos em jejum de 14 horas. Na manhã do terceiro dia de experimento, a glicemia foi determinada (tempo 0) com auxílio de glicosímetro (ACCU-CHEK®) e os animais submetidos à sobrecarga oral de glicose (2,5 g/kg). Em seguida, a glicose foi determinada nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a sobrecarga de glicose.

4.1.3. Avaliação do efeito direto do rolipram e de agonistas de PKA e EPAC na ativação de PKA e AKT e controle da proteólise na musculatura esquelética

De acordo com os resultados prévios obtidos com o tratamento de animais normais e diabéticos com inibidores de fosfodiesterases, optou-se em conduzir experimentos *ex-vivo* para verificação dos efeitos diretos do rolipram no controle de processos proteolíticos em músculos esqueléticos.

O tempo de incubação dos músculos com rolipram (100 µM) foi padronizado via ensaio temporal com músculos *soleus* e EDL de animais normais. Os músculos foram removidos, fixados por meio de seus tendões em suportes específicos que mantêm os seus comprimentos de repouso, e posteriormente incubados em tampão Krebs Riger-bicarbonato (120 mM de NaCl, 15 mM de NaHCO₃, 4,828 mM de KCl, 1,2 mM de MgSO₄, 1,212 mM de KH₂PO₄, 2,4 mM de CaCl₂, 5 mM glicose), pH 7,4, aerados com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e colocados em banho maria a 37°C sob agitação.

Após a pré-incubação (30 minutos), o tampão foi substituído, sendo em seguida os músculos incubados em diferentes tempos (15, 30 60, 90 e 120 minutos) em tampão Krebs Riger-bicarbonato acrescido de rolipram (100 µM). Ao final de cada tempo os músculos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* -80°C até análise dos níveis de fosforilação de AKT (Ser-473) e substratos fosforilados de PKA. Utilizamos como controle para este experimento músculos *soleus* e EDL de animais normais que foram incubados em tampão Krebs Riger-bicarbonato na ausência de rolipram em tempos de 0, 60 e 120 minutos.

Após a determinação do tempo ideal de incubação, animais normais e diabéticos (após 3 dias de indução do diabetes mellitus) foram eutanasiados por decapitação e os

músculos *soleus* e EDL foram removidos, fixados por meio de seus tendões em suportes específicos e posteriormente pré-incubados por 30 minutos, tal como descrito anteriormente. Após a pré-incubação, os músculos do mesmo animal foram incubados na ausência (músculos da pata direita) ou na presença (músculos da pata esquerda) de rolipram (100 μM), 6-Bnz-cAMP-AM (agonista de PKA, 16,6 μM) e 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM (agonista de EPAC, 16,6 μM). Após 1 hora de incubação, os músculos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* -80°C até análise dos níveis de fosforilação de AKT (Ser-473) e substratos fosforilados de PKA. Músculos incubados com rolipram também foram utilizados para dosagem de AMPc e o meio de incubação foi armazenado para a avaliação dos níveis de tirosina, um índice de proteólise total; neste caso, os músculos foram incubados na presença de cicloheximida (0,5 mM), inibidor de síntese proteica.

4.1.4. Determinação de glicose pelo método da glicose oxidase (Trinder, 1969)

A determinação da glicose plasmática foi realizada com kit comercial da Labtest pelo método da glicose oxidase. A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose à ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 formado reage com 4-aminoantipirina na presença de peroxidase, formando uma antipirilquinonimina (vermelha) monitorada à 505 nm.

4.1.5. Determinação de insulina sérica e citocinas TNF- α e IL-1 β

A determinação de insulina, TNF- α e IL-1 β foi realizada via ensaio Multiplex segundo orientações do fabricante (MILLIPLEX[®] MAP, RAT ADIPOKINE MAGNETIC BEAD PANEL, # RADPKMAG-80K). O ensaio Multiplex é utilizado para a determinação quantitativa simultânea de um conjunto de analitos séricos. O procedimento é realizado com microesferas de poliestireno (*beads*) acopladas a anticorpos específicos para os analitos. A fluorescência foi quantificada em Luminex 100 após a adição de um marcador fluorescente (estreptavidina). O equipamento faz a leitura das *beads* através de 2 feixes de lasers em um citômetro de fluxo. Os resultados foram calculados com uma curva padrão para cada analito e expressos em pg/mL.

4.1.6. Dosagem de tirosina (Waalkes e Udenfriend, 1957).

A determinação da tirosina no meio de incubação foi realizada por ensaio fluorimétrico, após a reação do 1-nitroso-2-naftol com a tirosina em meio ácido. O produto da reação foi quantificado nos comprimentos de excitação e emissão de 460 e 570 nm, respectivamente. A concentração de tirosina foi determinada por uma curva padrão de tirosina e o resultado final expresso em nmol de tirosina/mg de músculo/1 hora.

4.1.7. Atividade quimotripsina-like do proteassoma (Klaude et al., 2007)

Sobrenadantes obtidos após a homogeneização de músculos *soleus* e EDL em tampão (50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 1,8 mM de ATP; pH 7,2), seguida de centrifugação a 11000 rpm por 45 minutos a 4°C, foram adicionados ao tampão de reação (50 mM de Tris-HCl, 1 mM de ATP, 5 mM de MgCl₂ e 1 mM de DTT; pH 7,5) na presença de 100 µM do substrato específico para a atividade quimotripsina-like do proteassoma, succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC. As medidas de fluorescência da curva analítica de 7-amino-4-metilcumarina (AMC) e da AMC liberada nas amostras com sobrenadante e substrato foram realizadas em comprimentos de onda de excitação e emissão de 380 e 460 nm, respectivamente, a cada 10 minutos, durante 180 minutos. Ensaios controle foram conduzidos na presença de 90 µM de MG 132, inibidor do proteassoma. As diferenças entre a liberação de AMC das amostras na presença de substrato e na presença e ausência de MG 132 foram usadas como índice da atividade do proteassoma; a atividade foi determinada pela média da variação da fluorescência obtida a cada 10 minutos e expressa como nmol de AMC liberada.mg de proteína⁻¹.min⁻¹. A concentração de proteínas nos sobrenadantes foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951).

4.1.8. Atividade de calpaínas (Douillard et al., 2012)

Sobrenadantes obtidos após a homogeneização de músculos *soleus* e EDL em tampão (20 mM de Tris-HCl, 5 mM de EDTA, 1 mM de DTT e 0,1% de Triton X-100; pH 7,4), seguida de centrifugação a 1000 g por 10 minutos a 4°C, foram adicionados ao

tampão de reação (20 mM de Tris-HCl, 5 mM de CaCl₂, 1 mM DTT; pH 7,4), e a reação foi iniciada após a adição do substrato de calpaínas, N-Suc-Leu-Tyr-AMC, que no meio reacional atingiu concentração de 50 µM. Foram realizadas leituras de 10 em 10 minutos, em total de 180 minutos, da AMC liberada no meio. O mesmo ensaio foi repetido para cada amostra, na presença de 50 µM de calpeptina, inibidor da atividade proteolítica das calpaínas. Também foram realizadas leituras de fluorescência da curva padrão de AMC, nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 e 460 nm, respectivamente. A atividade das calpaínas foi determinada pela diferença nas leituras de fluorescência da AMC na presença de amostra, substrato e na ausência e presença de inibidor das calpaínas (calpeptina), e calculada pela média da variação da fluorescência a cada 10 minutos. Os resultados foram expressos como nmol de AMC.mg proteína⁻¹.min⁻¹.

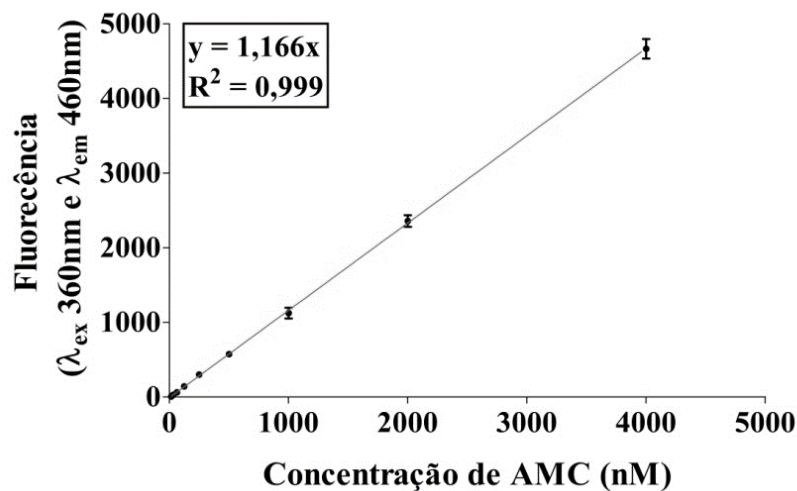
4.1.9. Atividade de caspase-3 (Du et al., 2004, com modificações)

Sobrenadantes obtidos após a homogeneização de músculos *soleus* e EDL em tampão (100 mM de HEPES, 10% de sacarose, 0,1% de Triton X-100, 10 mM de DTT; pH 7,5), seguida de centrifugação a 11000 rpm por 45 minutos a 4°C, foram adicionados ao tampão de reação (20 mM de HEPES, 2 mM de EDTA, 5mM de DTT; pH 7,4), e a reação foi iniciada após a adição do substrato para caspase-3, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-AMC, que no meio reacional atingiu concentração de 50 µM. O mesmo ensaio foi repetido, para cada amostra, na presença de 50 µM de N-Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-al, inibidor da atividade da caspase-3. Foram realizadas leituras de 10 em 10 minutos, em total de 180 minutos, da AMC liberada no meio. Também foram realizadas leituras de fluorescência da curva padrão de AMC nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 e 460 nm, respectivamente. A atividade foi determinada pela diferença nas leituras de fluorescência da AMC liberada das incubações de sobrenadante na presença de substrato e na ausência e presença do inibidor da protease, e calculada pela média da variação da fluorescência a cada 10 minutos. Os resultados foram expressos como nmol de AMC.mg proteína⁻¹.min⁻¹.

4.1.10. Curva analítica de 7-amino-4-metilcumarina (AMC)

As atividades de cada uma das proteases foram determinadas pela medida da fluorescência da AMC, nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 e 460 nm, respectivamente. Foi realizada curva analítica de AMC nas concentrações de 15,6 a 4000 nM (Figura 3).

Figura 3: Curva analítica de AMC.



4.1.11. Determinação do conteúdo de AMPc

Músculos *soleus* e EDL foram homogeneizados em TCA 6%, centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram lavados com 2 mL de éter dietílico e centrifugados a 2500 rpm, por 10 minutos a 4°C, sendo este procedimento repetido 3 vezes. Os sobrenadantes foram liofilizados e posteriormente ressuspensos em tampão de ensaio específico (disponibilizado pelo kit) para a determinação dos níveis de AMPc.

Os níveis de AMPc em músculos *soleus* e EDL foram determinados via ensaio imunoenzimático competitivo (GE Healthcare, RPN2251). A sensibilidade do método contempla faixa de detecção de 25 a 6400 fmol de AMPc por poço. Os resultados foram expressos em fmol de AMPc/mg de músculo.

4.1.12. Alterações nos níveis proteicos e/ou níveis de fosforilação de componentes dos sistemas proteolíticos, efetores intracelulares e fatores de transcrição (*Western blotting*)

Músculos *soleus* e EDL foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4; 4°C) contendo 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS, inibidores de proteases (5 µg/mL de aprotinina, 1 mM de PMSF, 2,34 mM de leupeptina) e inibidores de fosfatases (10 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de ortovanadato de sódio). Os homogenatos foram centrifugados a 11000 rpm e 4°C durante 30 minutos e os sobrenadantes utilizados para a determinação da concentração de proteínas, utilizando albumina bovina sérica como padrão (Lowry et al. (1951).

Amostras de sobrenadantes foram misturadas em partes iguais de tampão de amostra (62,5 mM de Tris-HCl, 10% de glicerol, 2% de SDS, 100 mM de ditioneitol, 0,1% de azul de bromofenol, pH 6,8) fervidas por 3 minutos e 100 µg de proteínas foram submetidas à eletroforese tipo SDS-PAGE em gel de acrilamida/bisacrilamida, de 8 a 16% (Laemmli, 1970), em aparato de gel miniatura da Bio-Rad (Mini-Protean, BioRad Laboratories).

A eletrotransferência das proteínas do gel para membranas de nitrocelulose foi realizada em tampão de transferência (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 10% metanol, 0,05% de SDS, pH 8,3) durante 180 minutos à amperagem constante de 350 mA em aparato de transferência miniatura da Bio-Rad (MiniProtean), de acordo com Towbin et al. (1979), modificado.

Antes das incubações das membranas com os anticorpos primários e secundário, ligações não específicas dos anticorpos às membranas de nitrocelulose foram reduzidas pela pré-incubação das membranas em tampão de bloqueio (10% de leite desnatado, 10 mM de Tris, 125 mM de NaCl e 0,05% de Tween 20, pH 7,6), durante 1 hora.

Posteriormente, as membranas foram incubadas a 4°C *overnight* com anticorpos primários específicos: anti-ubiquitina (1:1000), anti-MuRF-1 (1:1000), anti-atrogin-1 (1:1000), anti-caspase-3 (1:1000), anti-Bax (1:1000), anti-Bcl-2 (1:1000), anti-m-calpaína (1:1000), anti-calpastatina (1:1000), anti-CREB (1:1000), anti-p-[Ser-133]-CREB (1:1000), anti-EPAC1 (1:1000), anti-AKT (1:500), anti-p-[Ser-473]-AKT (1:500), anti-p-[Thr-308]-AKT (1:500), anti-FoxO1 (1:1000), anti-FoxO3a (1:750),

anti-p-[Thr-24]-FoxO1/p-[Thr-32]-FoxO3a (1:750), anti-substratos fosforilados de PKA (1:1000) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Anti-alfa-tubulina (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) na diluição 1:1000 foi usada como controle interno. Os anticorpos foram preparados em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,6) contendo 125 mM de NaCl, 0,05% de Tween 20, 1,5 mM de azida sódica e 2,5% de albumina bovina sérica.

Após lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG conjugado à *horseradish* peroxidase (HRP) na diluição 1:1000 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), durante 1 hora à temperatura ambiente. Novamente as membranas foram lavadas e em seguida incubadas com substrato quimiluminescente (1,25 mM de luminol, 4 mM mM de ácido p-iodofenilborônico, 5,3 mM de peróxido de hidrogênio, Tris-HCl 0,1 M, pH 8,8) de acordo com Haan e Behrmann (2007), com modificações. A quimiluminescência foi detectada por equipamento C-Digit Blot Scanner (LI-COR, Lincoln, NE, USA) e as intensidades das bandas foram determinadas utilizando o programa LI-COR Image Studio 4.0.

4.2.Experimento II: Avaliação do papel de PDE4D no controle da via autofágica-lisossomal em músculos de camundongos alimentados ou jejuados

4.2.1. Preparo do RNA de interferência (SiRNA) para silenciamento de PDE4D

Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Marco Sandri, no Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade de Padova, *Venetian Institute of Molecular Medicine*, Padova, Itália.

Oligos comerciais desenvolvidos para o silenciamento da PDE4D foram adquiridos da Invitrogen[®] com as seguintes sequências:

| | | |
|---------|--------|--|
| Oligo 1 | Top | TGCTGTACAGCTTCCTCCTCAACCTGGTTTTGGCCACTGACTGA CCAGGTTGAAGGAAGCTGTA |
| | Bottom | CCTGTACAGCTTCCTTCAACCTGGTCAGTCAGTGGCCAAAACC AGGTTGAGGAGGAAGCTGTAC |
| Oligo 2 | Top | TGCTGATCACTGGCAATCGAGGAGTTGTTTTGGCCACTGACTGA CAACTCCTCTTGCCAGTGAT |
| | Bottom | CCTGATCACTGGCAAGAGGAGTTGTCAGTCAGTGGCCAAAACA ACTCCTCGATTGCCAGTGATC |
| Oligo 3 | Top | TGCTGTTTGCTTGGAGAATCAGCCCAGTTTTGGCCACTGACTGA CTGGGCTGACTCCAAGCAA |
| | Bottom | CCTGTTTGCTTGGAGTCAGCCCAGTCAGTCAGTGGCCAAAAC GGGCTGATTCTCCAAGCAAAC |
| Oligo 4 | Top | TGCTGTTTCAGATCAGCCAGCAGGTTGTTTTGGCCACTGACTGA CAACCTGCTCTGATCTGAAA |
| | Bottom | CCTGTTTCAGATCAGAGCAGGTTGTCAGTCAGTGGCCAAAACA ACCTGCTGGCTGATCTGAAAC |

Os oligos foram devidamente anelados segundo protocolo do fabricante e inseridos em vetores (plasmídeos) de acordo com o o Kit BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector, Invitrogen.

Bactérias *Escherichia coli* competentes foram transformadas com os vetores (plasmídeos) construídos via choque térmico em meio de cultura *Super Optimal Broth* (S.O.C.). Após a inserção dos vetores nas bactérias, estas foram semeadas em meio de *Lysogeny broth* (LB) contendo 50 µg/mL de estreptomicina, *overnight* a 37°C. Três colônias de cada um dos vetores foram selecionadas aleatoriamente para crescimento em meio LB com estreptomicina e os vetores foram em seguida purificados com o kit de *NucleoSpin Plasmid* e sequenciados para verificar o correto anelamento dos oligos.

4.2.2. Transfecção dos SiRNA em células C2C12

Células C2C12 foram cultivadas em meio DMEM com penicilina-estreptomicina e plaqueadas em placas de 6 poços. Inicialmente, para verificar a expressão da PDE4D nos diferentes estágios de diferenciação da célula muscular, as células C2C12 foram induzidas a diferenciação de células mioblásticas para miotubos, utilizando meio DMEM com soro de cavalo. A expressão de PDE4D foi quantificada

por PCR-RT em células mioblásticas, miotubos e músculos *tibialis anterior* (TA) e *flexor digitorum brevis* (FDB).

Após confirmação da expressão de PDE4D, 5×10^5 células mioblásticas com 70 a 90% de confluência, em placas de 6 poços, foram transfectadas com o SiRNA para PDE4D com o kit Lipofectamine 2000, de acordo com os procedimentos indicados pelo fabricante. As células foram incubadas por 24 e 48 horas para verificar a eficiência de silenciamento da expressão de PDE4D.

4.2.3. Eletroporação do SiRNA para PDE4D em músculos de camundongos – desenho experimental

Experimentos *in vivo* foram realizados com camundongos *swiss* fêmeas com 4 semanas. Em animais sob anestesia com zoletil e xilasina, músculos esqueléticos TA foram expostos após uma pequena incisão e 25 μ g de SiRNA foram injetados ao longo do comprimento do músculo. Dois eletrodos em forma de espátula de aço inoxidável foram posicionados, um embaixo e outro sobre o músculo, e aplicados pulsos elétricos (50 volts/cm, 5 pulsos, intervalos de 200 ms). Músculos FDB foram previamente tratados com ácido hialurônico por 1 hora antes da injeção 15 μ g do SiRNA. Dois eletrodos em forma de agulhas de aço inoxidável foram colocados nos pés e aplicados os pulsos elétricos (99,9 volts/cm, 20 pulsos, intervalos de 999 ms) (Sandri et al., 2004). Cada animal foi eletroporado com SiRNA para PDE4D na pata direita, e com vetor controle (vazio) na pata esquerda.

Nove dias após a eletroporação, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos alimentados e jejuados, sendo o grupo jejuado submetido ao jejum de 24 horas. No décimo dia após a eletroporação, os camundongos foram eutanasiados e os músculos esqueléticos foram removidos, pesados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* -80°C para posterior análises.

4.2.4. Avaliação do fluxo autofágico em músculos esqueléticos

O fluxo autofágico *in vivo* foi monitorado pela administração de colchicina (Klionsky et al., 2016). No 9º dia após a eletroporação, parte dos animais foi separada e

tratada com 0,4 mg/kg de colchicina ou veículo por via intraperitoneal e separados nos grupos experimentais anteriormente citados. A administração de colchicina foi repetida 12 horas após e com 24 horas os animais foram pesados e eutanasiados; os músculos TA e FDB foram coletados, pesados e congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em *freezer* -80°C. As alterações no acúmulo de LC3-II foram monitoradas por PCR-RT.

4.2.5. Análise da expressão gênica de PDE4D, LC3b e p62

O RNA total foi extraído dos músculos esqueléticos com reagente Trizol e tratados com DNase I (Invitrogen, Paisley, UK) de acordo com o protocolo do fabricante. O rendimento e pureza do extrato total de RNA foram determinados usando um espectrofotômetro *Nanodrop* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os cDNAs foram gerados com o Kit *iScript cDNA Synthesis* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e analisados por PCR em tempo real no termociclador *MJ Mini Opticon Thermal Cycler* (Bio-Rad) usando *SYBR green super*. Primers específicos para PDE4D, LC3b e p62 foram desenhados. Os dados foram normalizados pela expressão de *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* (HPRT) ou β -actina.

| | | |
|-----------------|---------|--------------------------|
| PDE4D | Forward | TGTGTTACAGACTTGGAGA |
| | Reverse | TGATGGTTCTCTAGGACCGAG |
| LC3b | Forward | CACTGCTCTGTCTTGTGTAGGTTG |
| | Reverse | TCGTTGTGCCTTTATTAGTGCATC |
| p62 | Forward | CCCAGTGTCTTGGCATTCTT |
| | Reverse | AGGGAAAGCAGAGGAAGCTC |
| HPRT | Forward | TGACCTTGATTTATTTTGCATACC |
| | Reverse | CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT |
| β -actina | Forward | CAAACATCCCCAAGTTCTAC |
| | Reverse | TGAGGGACTTCCTGTAACCAC |

4.2.6. Análise da área das fibras musculares transfetadas

A quantificação da área das fibra de músculos TA foi realizada em criosecções transversais dos músculos esqueléticos com criostato (Leica CM1850) e analisadas em microscópio de fluorescência. Foram obtidas imagens de todo o corte do músculo em

filtro para luz branca e verde, em um aumento de 20 vezes. As imagens nos diferentes filtros foram sobrepostas com photoshop CS6 e analisadas usando o software ImageJ para quantificação da área das fibras transfectadas (que apresentavam fluorescência) e de fibras não transfectadas (que não apresentavam fluorescência).

4.3. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise de variância One-Way ANOVA seguida do teste Student-Newman-Keuls foi utilizada para a comparação dos resultados dos tratamentos com pentoxifilina ou rolipram. Teste t-student foi utilizado nas análises dos resultados da incubação temporal de músculos com rolipram, 6-Bnz-cAMP-AM e 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM e nos experimentos de silenciamento para PDE4D. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism[®] 5 (Version 5.01, GraphPad Software, Inc., USA).

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do tratamento de ratos diabéticos com inibidores de fosfodiesterases (pentoxifilina e rolipram) no controle do metabolismo proteico na musculatura esquelética

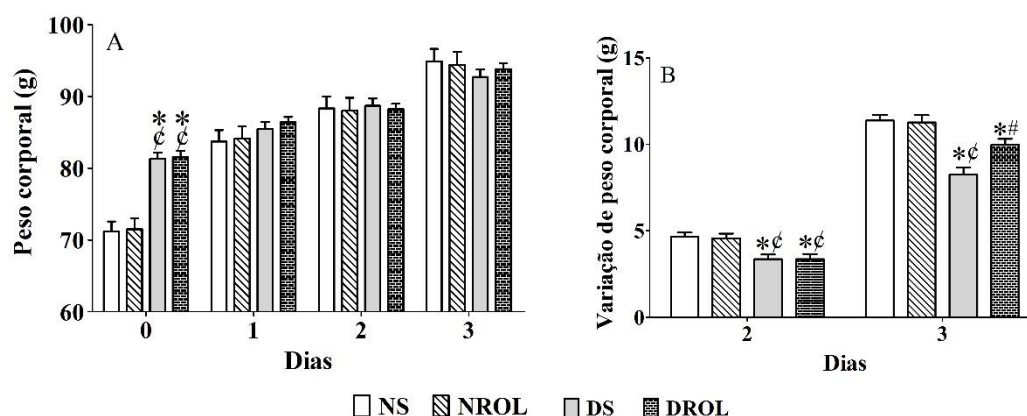
Os resultados referentes ao tratamento de ratos diabéticos com 25 mg/kg de pentoxifilina e as consequências no metabolismo proteico muscular estão apresentados na forma de artigo publicado, no ANEXO IV (*Involvement of cAMP/EPAC/Akt signaling in the antiproteolytic effects of pentoxifylline on skeletal muscles of diabetic rats*, na revista *Journal of Applied Physiology*). O tratamento de ratos diabéticos (3 dias pós-STZ) com pentoxifilina foi capaz de atenuar a perda de massa muscular em *soleus* e EDL. Os níveis de atrogin-1 e MuRF-1 (*soleus* e EDL), bem como os níveis de conjugados ubiquitinados (EDL) foram reduzidos, refletindo em redução na atividade do proteassoma. As proteases que participam da liberação de proteínas do sarcômero, incluindo caspase-3 (EDL) e calpaínas (*soleus* e EDL) também apresentam atividades reduzidas em animais diabéticos tratados com pentoxifilina. O tratamento com pentoxifilina diminuiu a atividade de PDE e promoveu um aumento no conteúdo de AMPc em músculos de animais normais e diabéticos. Além disso, o tratamento com pentoxifilina promoveu um aumento nos níveis de proteicos de EPAC e de fosforilação de AKT (Ser-473 e Thr-308).

Os resultados referentes ao tratamento de ratos diabéticos com 2 mg/kg de rolipram e os impactos no metabolismo proteico muscular estão apresentados nesta sessão.

Na Figura 4 estão apresentados os valores médios relacionados à evolução de peso corporal (A) e variação de peso corporal (B) de animais normais e diabéticos que receberam salina ou rolipram (ROL) durante 3 dias. Ratos normais, tratados com salina ou rolipram, mesmo iniciando o experimento com valores de peso corporal estatisticamente menores em relação aos animais diabéticos, após 3 dias de experimento alcançaram valores de peso corporal semelhantes aos animais diabéticos (Figura 4A). A taxa média de crescimento corporal de animais normais calculada em relação ao início de tratamento (dia 1) foi de 8 g/dia. Animais diabéticos, tratados com salina

apresentaram um ganho de peso corporal de 5,8 g/dia, enquanto que animais tratados com rolipram apresentaram um ganho de peso corporal de 6,7 g/dia (Figura 4B).

Figura 4: Valores médios de peso corporal (A) e variação de peso corporal (B) de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ¢, diferença com NROL; #, diferença com DS.

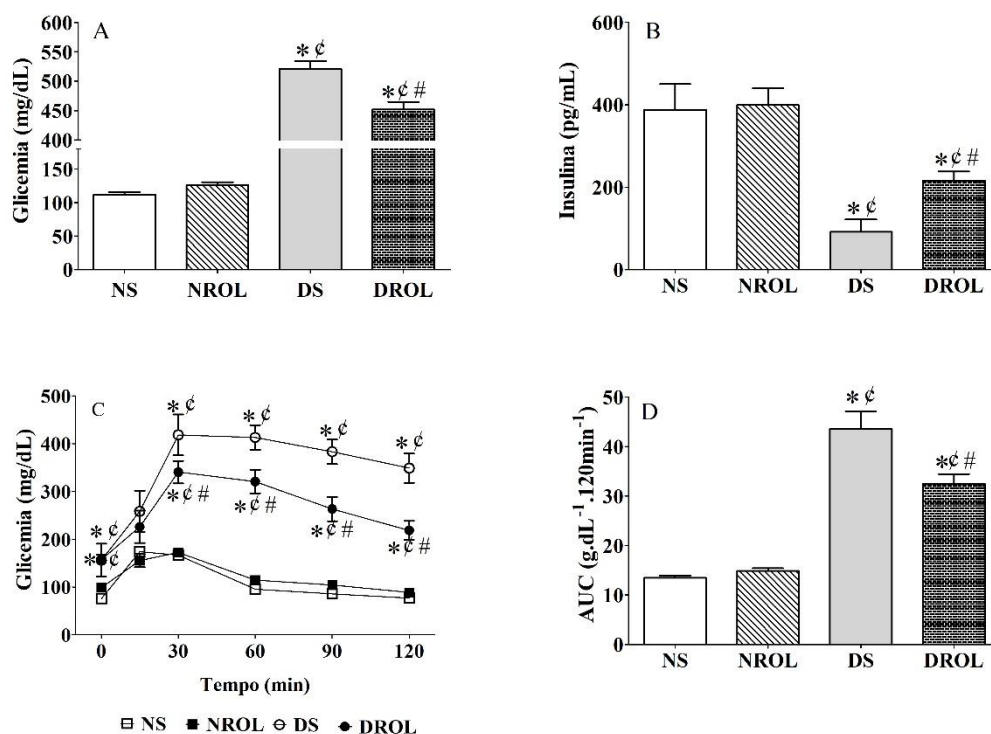
Na Figura 5 estão apresentados os valores médios de glicemia (A), insulina sérica (B), TTGO (C) e área sobre a curva (AUC) da glicemia no TTGO (D) de animais normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou com rolipram. Os valores médios de glicemia dos animais normais tratados com salina ou rolipram foram de aproximadamente 115 mg/dL, enquanto que os animais diabéticos tratados com salina apresentaram valores médios de glicemia de aproximadamente 490 mg/dL. Animais diabéticos tratados com rolipram apresentaram uma redução de 10% nos valores de glicemia (452 mg/dL) em relação aos animais DS (Figura 5A).

Os níveis de insulina sérica (Figura 5B) de animais normais tratados com salina ou rolipram foram semelhantes entre si e em valores de aproximadamente 400 pg/mL. Animais diabéticos tratados com salina apresentaram uma drástica redução nos níveis de insulina sérica (91 pg/mL), tal como esperado para este modelo experimental de diabetes mellitus induzido pela administração de STZ. O tratamento com rolipram promoveu um aumento de 136% nos níveis séricos de insulina de ratos diabéticos (215 pg/mL), em relação aos valores observados em DS.

No TTGO, o pico glicêmico do grupo DS, 30 minutos após a sobrecarga de glicose, foi aproximadamente 2,5 vezes maior em relação ao pico glicêmico observado em animais do grupo NS. Após 120 minutos da sobrecarga de glicose, o grupo DS não foi capaz de reduzir a glicemia com a mesma eficiência do grupo NS, que apresentou valores semelhantes ao tempo 0 (Figura 5C). Quando analisamos a AUC, podemos observar que a tolerância à glicose está diminuída em animais do grupo DS, quando comparados ao grupo NS (Figura 5D).

Animais normais tratados com rolipram (NROL) não apresentaram alteração na tolerância à glicose em relação aos animais NS (Figuras 5C e D). Animais diabéticos tratados com rolipram (DROL) apresentaram um pico glicêmico 18% menor em relação aos animais DS (Figura 5C) e após 120 minutos, os níveis glicêmicos estavam próximos aos do tempo 0. Tal perfil refletiu em uma redução de 25% na AUC do grupo DROL em relação ao grupo DS (Figura 5D).

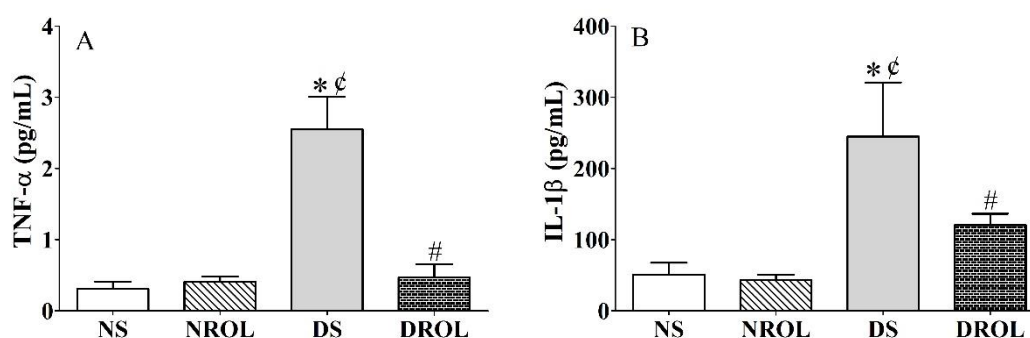
Figura 5: Valores médios de glicemia (A), insulina (B), TTGO (C) e AUC (D) de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ϕ , diferença com NROL; #, diferença com DS.

Na Figura 6 estão apresentados os valores médios referentes aos níveis séricos de TNF- α e IL-1 β de animais normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou rolipram. Animais NS e NROL mantiveram níveis séricos basais de TNF- α e IL-1 β (Figura 6A e B, respectivamente) e semelhantes entre si. Animais diabéticos DS apresentaram aumentos de 720 e 270%, respectivamente, nos níveis de TNF- α e IL-1 β em relação aos animais NS. O tratamento com rolipram promoveu reduções significativas nos níveis de TNF- α e IL-1 β (81 e 28%, respectivamente), em relação ao grupo DS, alcançando valores estatisticamente semelhantes aos observados em animais normais (Figura 6A e B).

Figura 6: Níveis séricos de TNF- α (A) e IL-1 β (B) de ratos normais e diabéticos tratados após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.



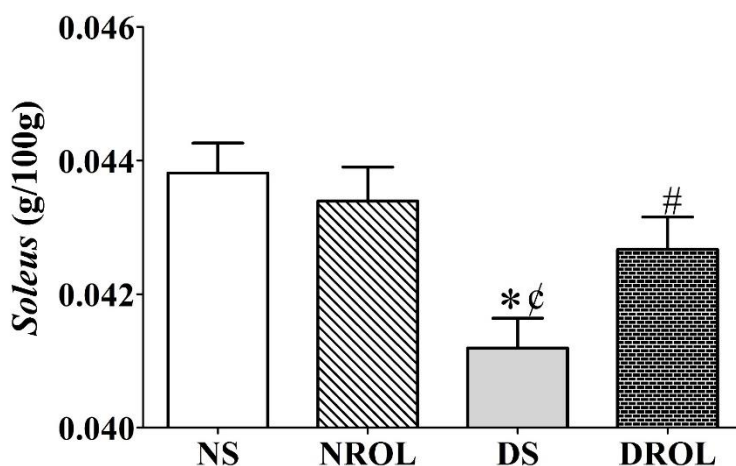
As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ζ , diferença com NROL; #, diferença com DS.

5.1.1. Avaliação das alterações nos processos proteolíticos e efetores intracelulares em *soleus* de animais normais e diabéticos tratados com 2 mg/kg de rolipram

Na Figura 7 encontram-se os valores médios dos pesos dos músculos *soleus* de animais normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram, após 3 dias. Animais diabéticos tratados com salina (DS) apresentaram uma redução no peso de *soleus* de 6%, quando comparado ao grupo NS (Figura 7). Ratos diabéticos tratados com rolipram (DROL) apresentaram maiores valores de peso de *soleus* em relação aos ratos DS; o

peso de *soleus* em ratos DROL foi 3,6% maior em relação aos valores de DS. Vale a pena destacar que o peso de *soleus* em DROL foi estatisticamente semelhante aos valores encontrados em NS e NROL (Figura 7).

Figura 7: Valores médios de peso de músculos *soleus* (g/100g) de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.

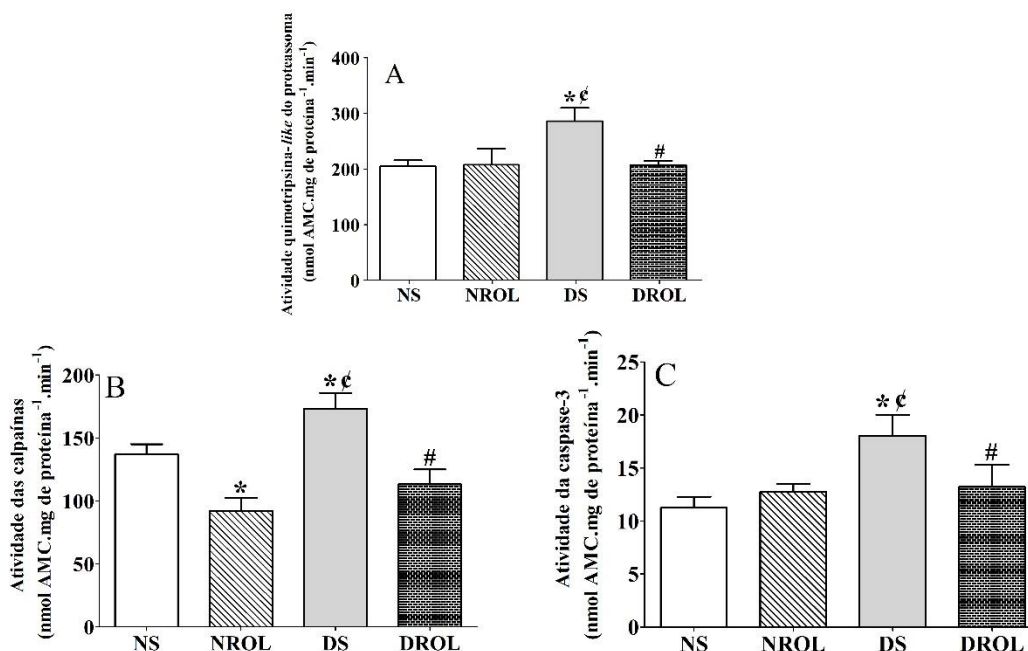


As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ç, diferença com NROL; #, diferença com DS.

Na Figura 8 encontram-se os valores médios das atividades quimotripsina-like do proteassoma (A), de calpaínas (B) e de caspase-3 (C) em músculos *soleus* de animais normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram. Animais DS apresentaram um aumento de 37% na atividade do proteassoma quando comparados aos valores encontrados em animais NS, o que pode explicar, pelo menos em parte, o menor ganho de massa muscular observado em ratos diabéticos DS. A atividade do proteassoma em *soleus* de ratos diabéticos tratados com rolipram (DROL) foi 27% menor quando comparada ao DS (Figura 8A).

Houve um aumento nas atividades de calpaínas (24%) e de caspase-3 (61%) em *soleus* de ratos diabéticos DS, em relação aos valores encontrados em animais NS. A atividade das calpaínas em *soleus* de animais normais ROL foi 33% menor quando comparada aos animais NS. Animais diabéticos tratados com rolipram (DROL) apresentam uma queda nas atividades de caspase-3 (27%) e de calpaínas (36%), em relação aos valores encontrados em animais DS (Figura 8B e C).

Figura 8: Atividades quimotripsina-like do proteassoma (A), de calpaínas (B) e de caspase-3 (C) (nmol AMC.mg proteína⁻¹.min⁻¹) em músculos *soleus* de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.

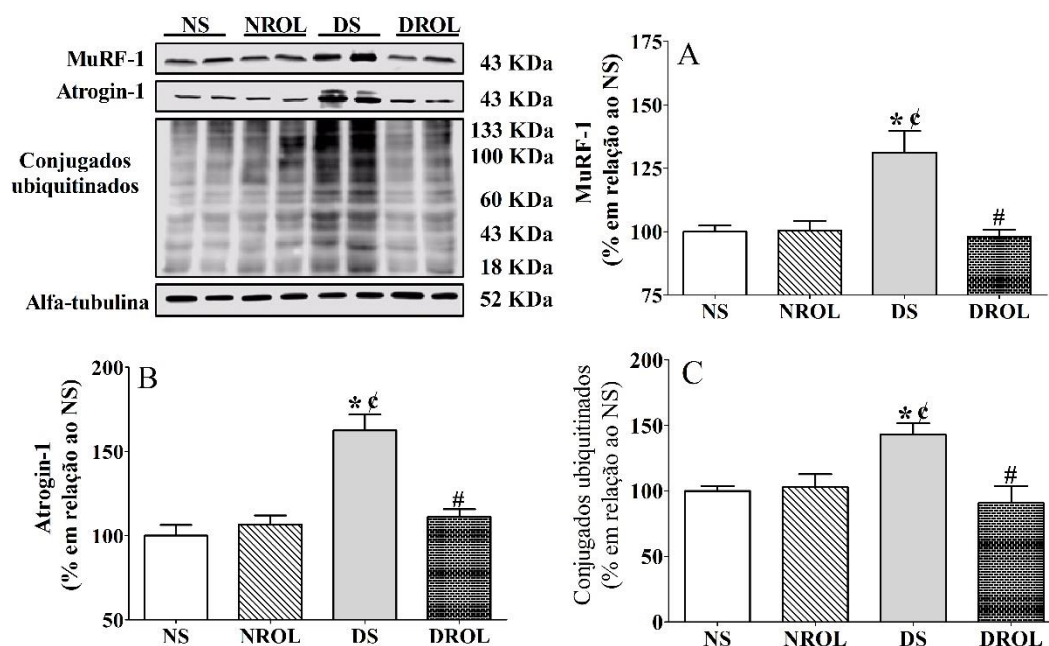


As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ϕ, diferença com NROL; #, diferença com DS.

Na Figura 9 encontram-se os resultados referentes às mudanças nos níveis proteicos de MuRF-1 (A), atrogin-1 (B) e conjugados ubiquitinados (C) em músculos *soleus* de animais normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram. Animais diabéticos DS apresentaram aumentos de 31 e 62%, respectivamente, nos níveis de MuRF-1 (Figura 9A) e atrogin-1 (Figura 9B) em músculos *soleus*, em relação aos animais normais NS. O tratamento de animais diabéticos com rolipram (DROL) promoveu redução na expressão de MuRF-1 (74%, Figura 9A) e de atrogin-1 (68%, Figura 9B) em músculos *soleus*, quando comparados aos valores em DS, alcançando níveis semelhantes aos observados em animais normais NS. Músculos *soleus* de animais DS apresentaram um aumento de 43% nos níveis de conjugados ubiquitinados, quando comparado ao grupo NS. O tratamento de ratos diabéticos com rolipram foi capaz de promover uma redução de 63% nos níveis de conjugados ubiquitinados em *soleus*,

quando comparado aos valores encontrados em DS, alcançando níveis semelhantes aqueles observados em *soleus* de animais NS.

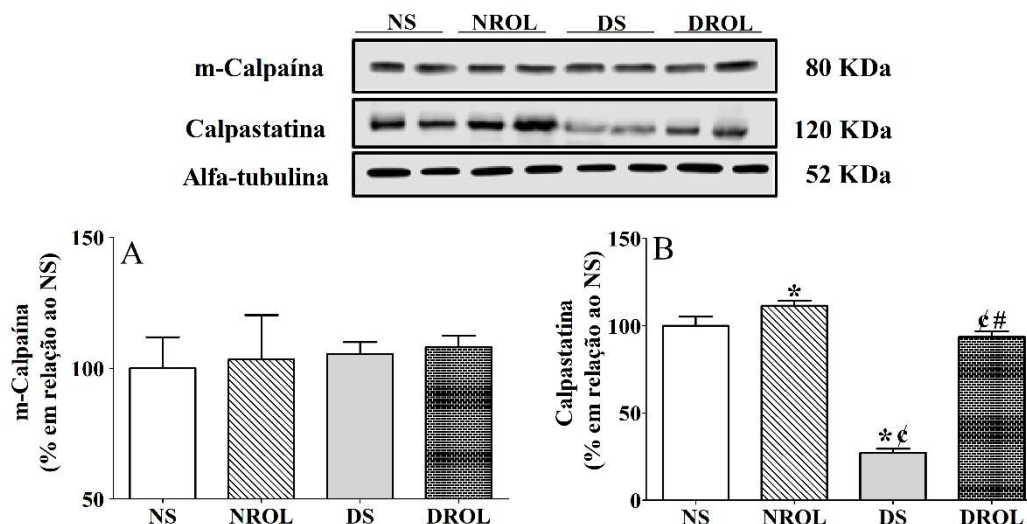
Figura 9: Níveis proteicos de MuRF-1 (A), atrogin-1 (B) e conjugados ubiquitinados (C) em músculos *soleus* de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ϕ, diferença com NROL; #, diferença com DS.

Na Figura 10 estão apresentados os resultados relacionados aos níveis proteicos de m-calpaína (A) e calpastatina (B) em *soleus* de ratos normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram. Não existem diferenças quando comparados os níveis de m-calpaína em *soleus* entre ratos normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram. Houve uma redução de 68% nos níveis proteicos de calpastatina, inibidor endógeno das calpaínas, em músculos *soleus* de ratos diabéticos DS. O tratamento de ratos diabéticos com rolipram foi capaz de atenuar esta redução, uma vez que os níveis de calpastatina em *soleus* de animais DROL foram 244% maiores em relação aos valores em animais DS (Figura 10B)

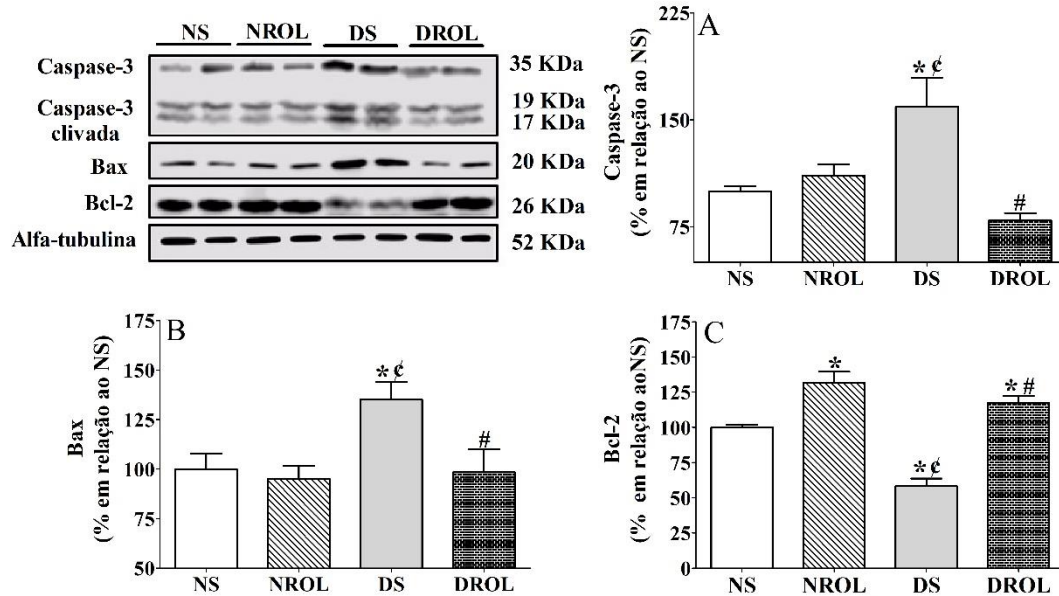
Figura 10: Níveis proteicos de m-calpaína (A) e calpastatina (B) em músculos *soleus* de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ϕ, diferença com NROL; #, diferença com DS.

Na Figura 11 estão apresentados os resultados relacionados aos níveis proteicos de caspase-3 (A), Bax (B) e Bcl-2 (C) em *soleus* de ratos normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram. Não existem diferenças significativas quando se comparam os níveis de caspase-3 em *soleus* de ratos normais tratados com salina ou com rolipram (Figura 11A). Animais diabéticos DS apresentaram um aumento de 59% nos níveis proteicos de caspase-3 em relação ao grupo NS. Já o tratamento de ratos diabéticos com rolipram (DROL) promoveu uma redução de 50% nos níveis de caspase-3 em *soleus*, quando comparados aos valores em DS (Figura 11A). Os níveis proteicos da proteína pró-apoptótica Bax foram 35% maiores em *soleus* de ratos DS, e tal aumento foi prevenido pelo tratamento com rolipram (Figura 11B). Em relação aos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2, houve uma redução de 47% em *soleus* de animais diabéticos DS, e quando animais diabéticos foram tratados com rolipram, tal redução não mais é observada (Figura 11C).

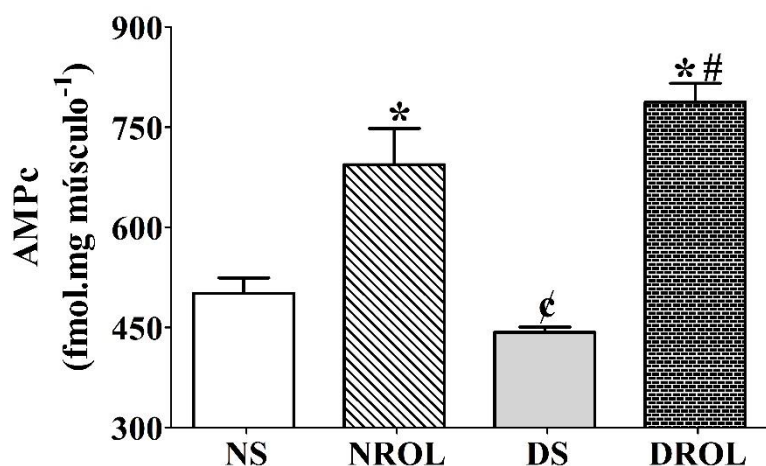
Figura 11: Níveis proteicos de caspase-3 (A), Bax (B) e Bcl-2 (C) em músculos *soleus* de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ç, diferença com NROL; #, diferença com DS.

Na Figura 12 estão apresentados os resultados relacionados ao conteúdo de AMPc em *soleus* de ratos normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram. Não foram observadas diferenças no conteúdo de AMPc em músculos *soleus* entre ratos normais NS e ratos diabéticos DS. O tratamento de ratos normais ou diabéticos com rolipram (NROL e DROL) promoveu um aumento de 44 e 69%, respectivamente, no conteúdo de AMPc em *soleus* quando comparados aos valores em NS (Figura 12).

Figura 12: Níveis de AMPc em músculos *soleus* de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ç, diferença com NROL; #, diferença com DS.

Na Figura 13 estão representados os resultados referentes às alterações no conteúdo proteico e/ou níveis de fosforilação de substratos de PKA (A), CREB (B), EPAC1 (C), AKT (D), FoxO1 (E) e FoxO3a (F) de ratos normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram.

Os níveis de substratos fosforilados de PKA foram 55% menores em animais diabéticos DS quando comparados aos animais NS. O tratamento de ratos normais com rolipram promoveu um aumento (22%) na fosforilação dos substratos de PKA em músculos *soleus* em relação ao NS, enquanto que animais diabéticos tratados com rolipram apresentaram um aumento de 96% quando comparados aos animais DS (Figura 13A).

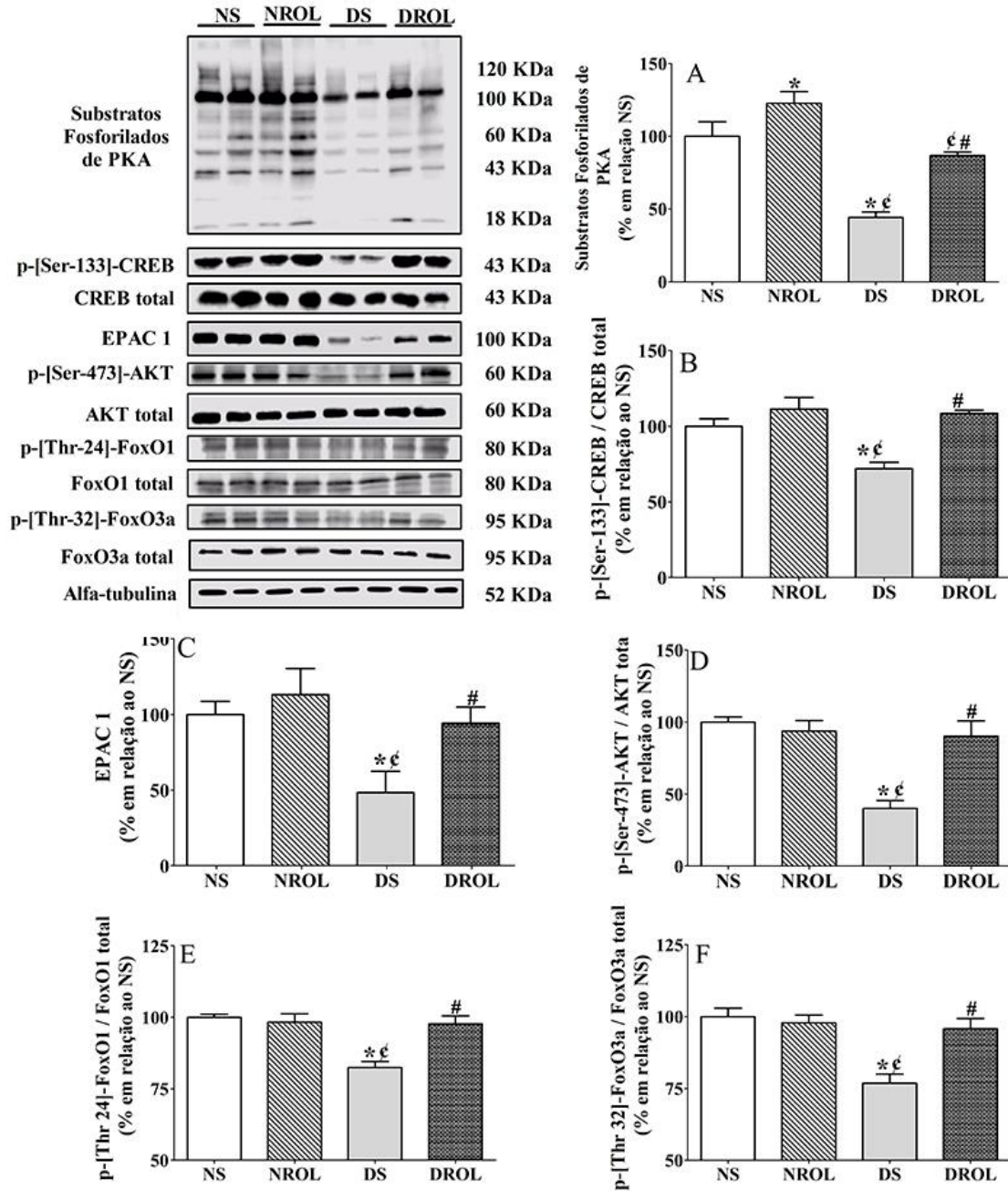
Tal como observado para os substratos de PKA, os níveis de fosforilação de CREB foram 28% menores em *soleus* de ratos diabéticos DS quando comparados aos valores observados em animais normais NS (Figura 13B). O tratamento de ratos diabéticos com rolipram praticamente preveniu a redução na fosforilação de CREB observada em animais DS, promovendo um aumento de 50% em relação aos animais DS, alcançando níveis de fosforilação semelhantes aos observados em animais normais tratados com salina ou rolipram (Figura 13B).

Não foram observadas diferenças nos níveis proteicos de EPAC1 em *soleus* de ratos normais tratados com salina ou com rolipram (Figura 13C). Semelhante ao perfil observado nos substratos de PKA, os níveis de EPAC1 foram reduzidos (51%) em *soleus* de animais diabéticos DS quando comparados aos valores encontrados no grupo NS. Os animais do grupo DROL apresentaram um aumento de 194% nos níveis de EPAC1 em músculos *soleus*, quando comparados aos valores em DS (Figura 13C).

Os níveis de fosforilação de AKT (Ser-473) em *soleus* foram reduzidos em 49% no grupo DS em relação aos animais NS. O tratamento de ratos diabéticos com rolipram praticamente preveniu a redução na fosforilação de AKT, promovendo um aumento de 47% nos níveis de fosforilação quando comparados ao grupo DS (Figura 13D).

Pode-se observar que os níveis de fosforilação de FoxO1 (Figura 13E) e de FoxO3a (Figura 13F) foram reduzidos em *soleus* de ratos diabéticos DS (17 e 23%, respectivamente), quando comparados aos animais NS. O tratamento de ratos diabéticos com rolipram promoveu aumentos na fosforilação de FoxO1 e de FoxO3a, em níveis semelhantes aos encontrados ratos normais tratados com salina ou rolipram.

Figura 13: Níveis proteicos e/ou de fosforilação de substratos de PKA (A), CREB (B), EPAC1 (C), AKT (D), FoxO1 (E) e FoxO3a (F) em músculos *soleus* de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ϕ, diferença com NROL; #, diferença com DS.

5.1.2. Avaliação do efeito direto do rolipram e de agonistas de PKA e EPAC em músculos *soleus* de animais normais e diabéticos

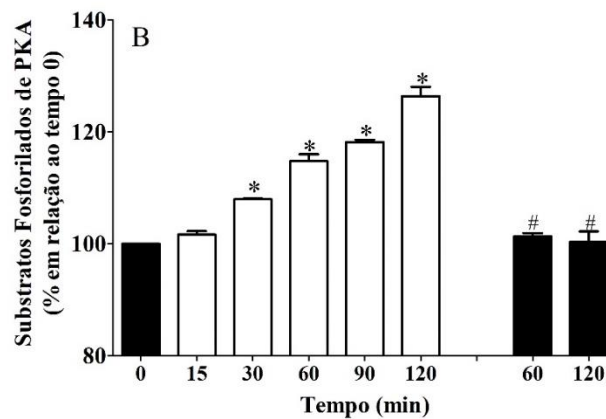
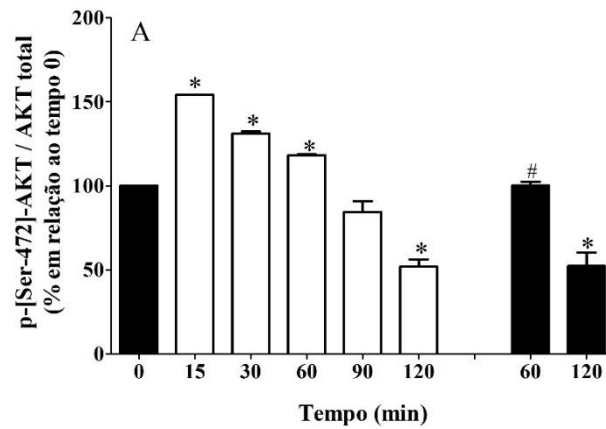
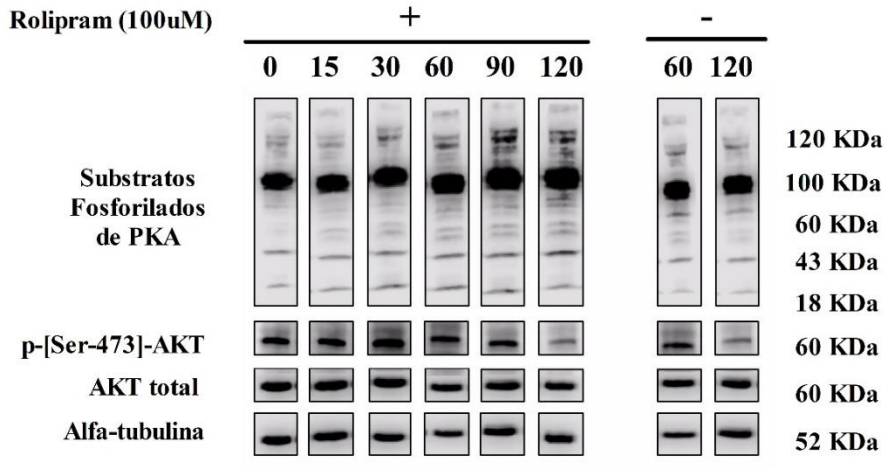
Na Figura 14 estão representados os resultados referentes às alterações nos níveis de fosforilação de AKT (A) e de substratos de PKA (B) de músculos *soleus* de ratos normais incubados na ausência e presença de rolipram (100 μ M), em diferentes tempos.

Os níveis de fosforilação de AKT foram 54, 31 e 18% maiores nos tempos de incubação 15, 30 e 60 minutos, respectivamente, quando comparados com o tempo 0 (Figura 14A). Músculos controles (incubados na ausência de rolipram), após 60 minutos de incubação, apresentavam fosforilação de AKT menor que os incubados na presença do fármaco durante 60 minutos. Após 90 minutos de incubação com rolipram, os níveis de fosforilação de AKT foram semelhantes ao tempo 0, e após 120 minutos de incubação com rolipram, houve inclusive uma redução de 48% na fosforilação de AKT em relação ao tempo 0 (Figura 14A). Vale ressaltar que os músculos controles, após 60 minutos de incubação, não apresentaram alterações nos níveis de fosforilação desta quinase quando comparados ao tempo 0, entretanto com 120 minutos de incubação, os valores foram significativamente menores em relação ao tempo 0 (Figura 14A).

Os níveis de substratos fosforilados de PKA estavam aumentados nos músculos *soleus* de animais normais incubados com rolipram, nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos, com aumentos de 7, 14, 18 e 26%, respectivamente, quando comparados ao tempo 0. Os músculos controle, após incubações de 60 e 120 minutos, não apresentaram nenhuma alteração nos níveis de fosforilação de substratos de PKA, em relação ao tempo 0 (Figura 14B).

A partir da análise das alterações temporais nos níveis de fosforilação de AKT e PKA, optou-se pela realização dos experimentos *ex vivo* com músculos de animais normais e diabéticos incubados com rolipram ou com agonistas de PKA e EPAC durante 1 hora.

Figura 14: Níveis de fosforilação de AKT (A) e de substratos de PKA (B) em músculos *soleus* de ratos normais incubados na ausência ou na presença de rolipram (100 μ M), em diferentes tempos.



Ausência de Rolipram
 Presença de Rolipram (100 μ M)

As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença em relação ao tempo 0; #, diferença em relação ao mesmo tempo na presença de rolipram.

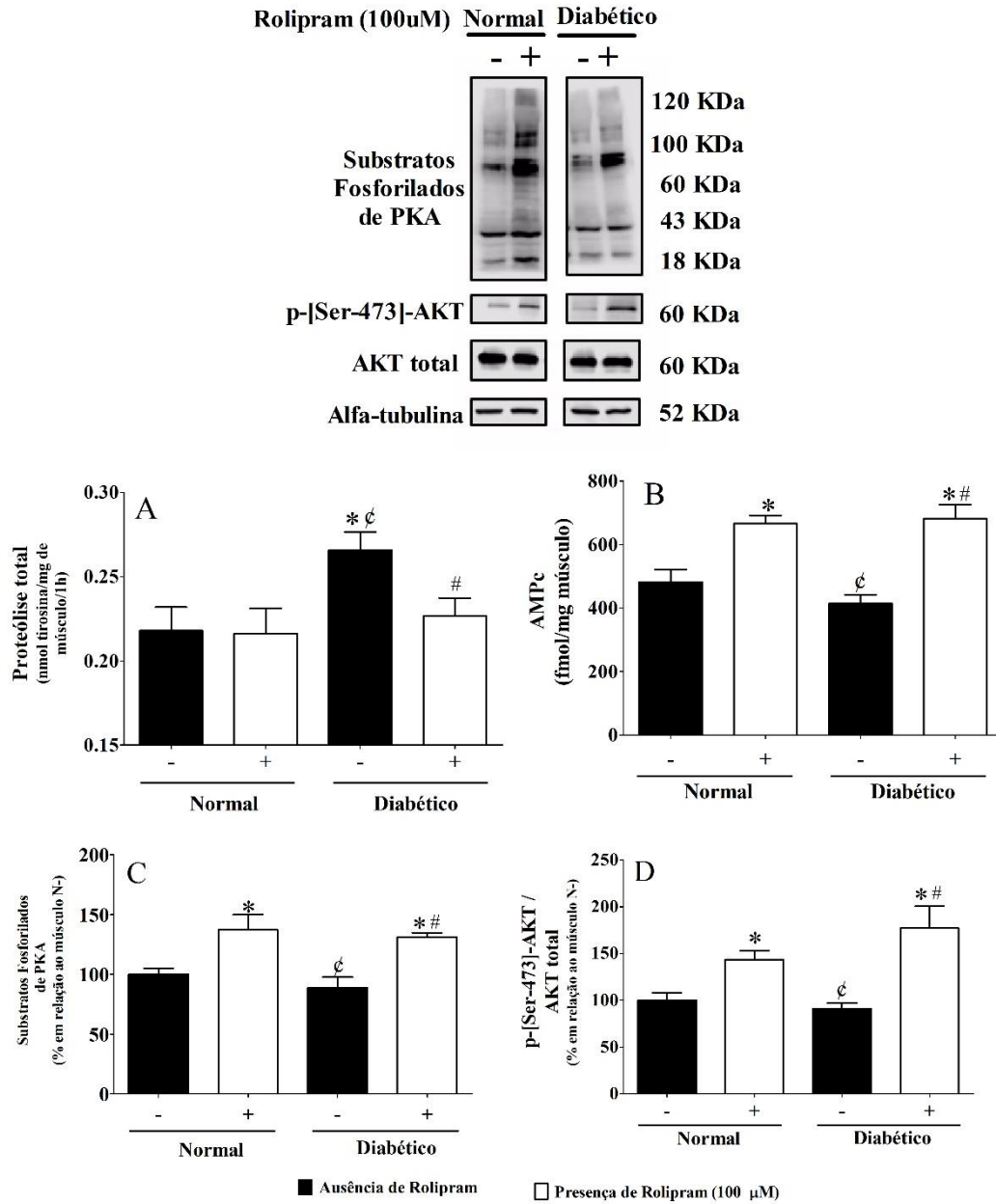
Na figura 15 estão apresentados os resultados de proteólise total (A), conteúdo de AMPc (B), níveis de fosforilação de substratos de PKA (C) e fosforilação de AKT (D) em músculos *soleus* de ratos normais e diabéticos incubados na ausência ou na presença de rolipram (100 μ M).

Observamos que a proteólise total, estimada pela liberação de tirosina no meio de incubação, estava aumentada (11%) em músculos *soleus* de animais diabéticos incubados na ausência de rolipram, em relação aos valores em músculos de animais normais. Músculos de animais normais incubados na ausência ou na presença de rolipram apresentaram velocidades de proteólise total semelhantes entre si, enquanto que a incubação de *soleus* de ratos diabéticos na presença de rolipram promoveu redução da proteólise total (10%) em relação aos valores de animais DS (Figura 15A).

Após 1 hora de incubação com rolipram, os conteúdos de AMPc estavam aumentados em músculos *soleus* de animais normais ou diabéticos, quando comparados aos músculos incubados na ausência do fármaco. Vale ressaltar que os conteúdos de AMPc em músculos *soleus* de animais normais e diabéticos incubados na ausência de rolipram foram semelhantes entre si (Figura 15B).

A incubação com rolipram promoveu aumentos nos níveis de fosforilação dos substratos de PKA, de 37% em músculos de animais normais e de 21% em músculos de animais diabéticos, em relação aos músculos de animais normais incubados na ausência de rolipram (Figura 15C). Os níveis de fosforilação de AKT também foram aumentados 43 e 50%, respectivamente, em músculos *soleus* de animais normais e diabéticos incubados na presença de rolipram, em relação aos músculos de animais normais incubados na ausência do fármaco. Músculos *soleus* de animais normais e diabéticos incubados na ausência de rolipram apresentaram valores de fosforilação de substratos de PKA (Figura 15C) e de fosforilação de AKT (Figura 15D) semelhantes entre si.

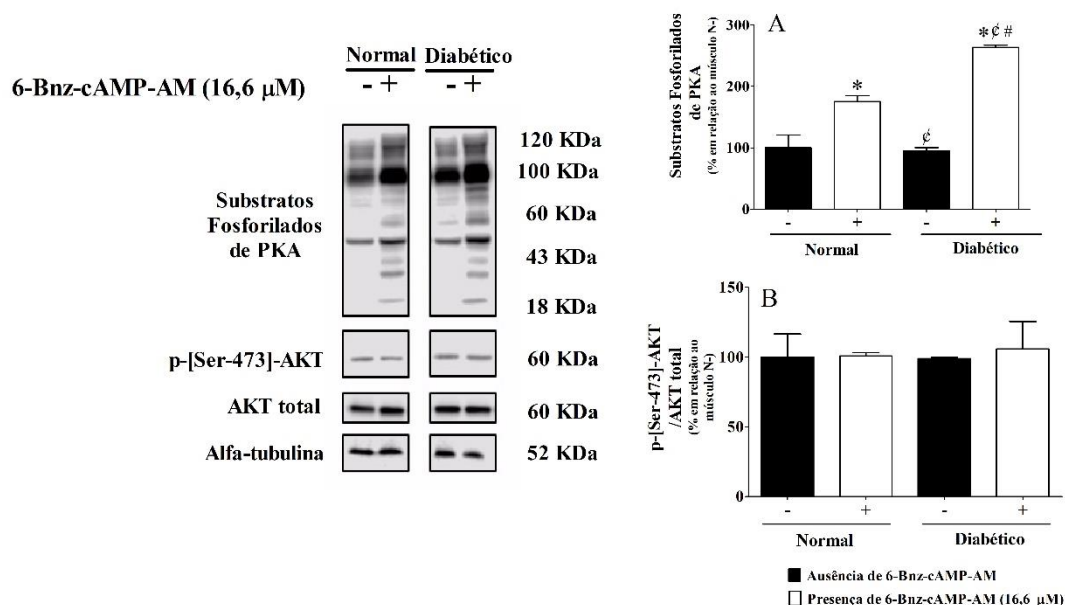
Figura 15: Proteólise total (A), conteúdo de AMPc (B), níveis de fosforilação de substratos de PKA (C) e de fosforilação de AKT (D) de músculos *soleus* de ratos normais e diabéticos incubados na ausência e presença de rolipram (100 μ M).



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com músculos de animais normais na ausência de Rolipram; ϕ , diferença com músculos de animais normais na presença de Rolipram; #, diferença com músculos de animais diabéticos na ausência de Rolipram.

Na Figura 16 estão apresentados os níveis de fosforilação de substratos de PKA (A) e níveis de fosforilação de AKT (B) em músculos *soleus* de ratos normais e diabéticos incubados na ausência ou na presença de 6-Bnz-cAMP-AM (agonista de PKA). A incubação de músculos *soleus* na presença de 6-Bnz-cAMP-AM promoveu aumentos de 63 e 163%, respectivamente, nos níveis de fosforilação de substratos de PKA em músculos de animais normais e diabéticos, quando comparados aos músculos de animais normais incubados na ausência do agonista de PKA. A incubação na ausência de 6-Bnz-cAMP-AM não promoveu alterações nos níveis de fosforilação de substratos de PKA em *soleus* (Figura 16A). Já os níveis de fosforilação de AKT não foram alterados em músculos de animais normais ou diabéticos incubados na ausência ou na presença de 6-Bnz-cAMP-AM (Figura 16B).

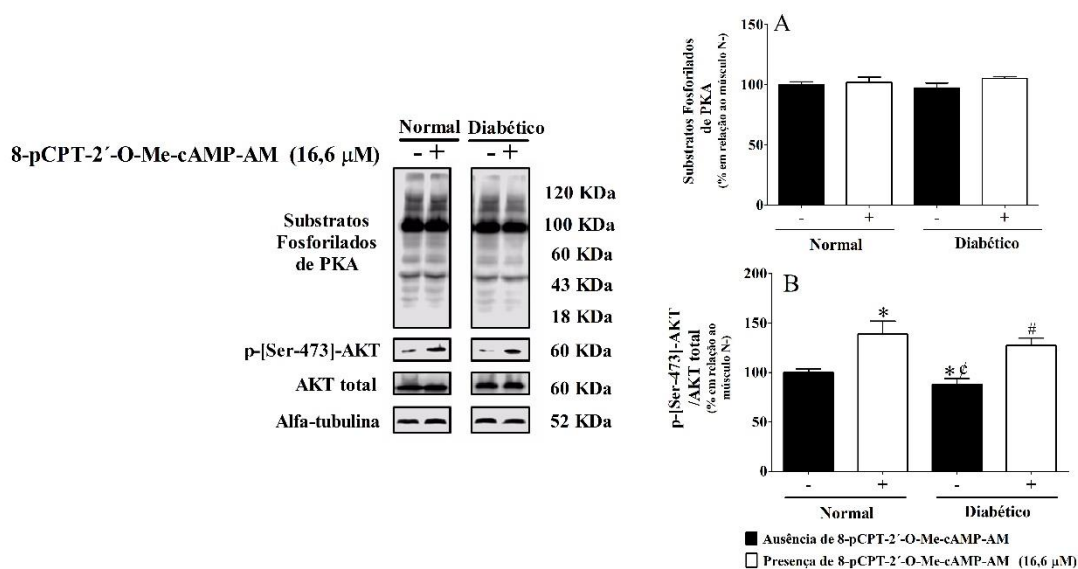
Figura 16: Níveis de fosforilação de substratos de PKA (A) e de fosforilação de AKT (B) de músculos *soleus* de ratos normais e diabéticos incubados na ausência e presença de 6-Bnz-cAMP-AM (agonista de PKA, 16,6 μ M).



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com músculos de animais normais na ausência de 6-Bnz-cAMP-AM; ϕ , diferença com músculos de animais normais na presença de 6-Bnz-cAMP-AM; #, diferença com músculos de animais diabéticos na ausência de 6-Bnz-cAMP-AM.

Na Figura 17 estão apresentados os níveis de fosforilação de substratos de PKA (A) e níveis de fosforilação de AKT (B) em músculos *soleus* de ratos normais e diabéticos incubados na ausência ou na presença de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM (agonista de EPAC). A incubação de músculos *soleus* na presença de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM promoveu aumentos de 38 e 27%, respectivamente, na fosforilação de AKT em músculos *soleus* de normais e diabéticos. Músculos controles incubados na ausência de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM não apresentaram alterações nos níveis de fosforilação de AKT (Figura 17B). Os níveis de fosforilação de substratos de PKA não foram alterados em músculos *soleus* de animais normais e diabéticos incubados na ausência ou na presença de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM (Figura 17A).

Figura 17: Níveis de fosforilação de substratos de PKA (A) e de fosforilação de AKT (B) de músculos *soleus* de ratos normais e diabéticos incubados na ausência e presença de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM (agonista de EPAC, 16,6 μ M).

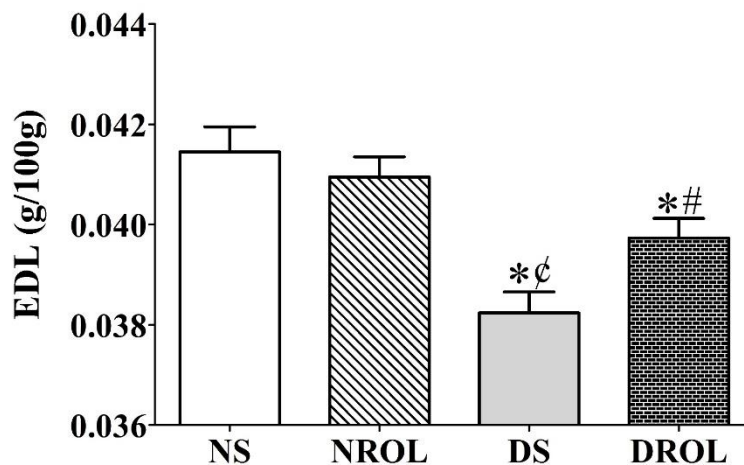


As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com músculos de animais normais na ausência de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM; ϕ , diferença com músculos de animais normais na presença de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM; #, diferença com músculos de animais diabéticos na ausência de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM.

5.1.3. Avaliação das alterações nos processos proteolíticos e efetores intracelulares em EDL de animais normais e diabéticos tratados com 2 mg/kg de rolipram.

Na Figura 18 encontram-se os valores médios dos pesos de músculos EDL de animais normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram. Animais diabéticos tratados com salina (DS) apresentaram uma redução no peso de EDL de 8%, quando comparados aos valores no grupo NS (Figura 18). Ratos diabéticos tratados com rolipram (DROL) apresentaram maiores valores de peso de EDL em relação aos ratos diabéticos DS; os pesos de EDL em ratos DROL foram 4% maiores em relação aos valores encontrados em animais DS.

Figura 18: Valores médios de peso de músculos EDL (g/100g) de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.



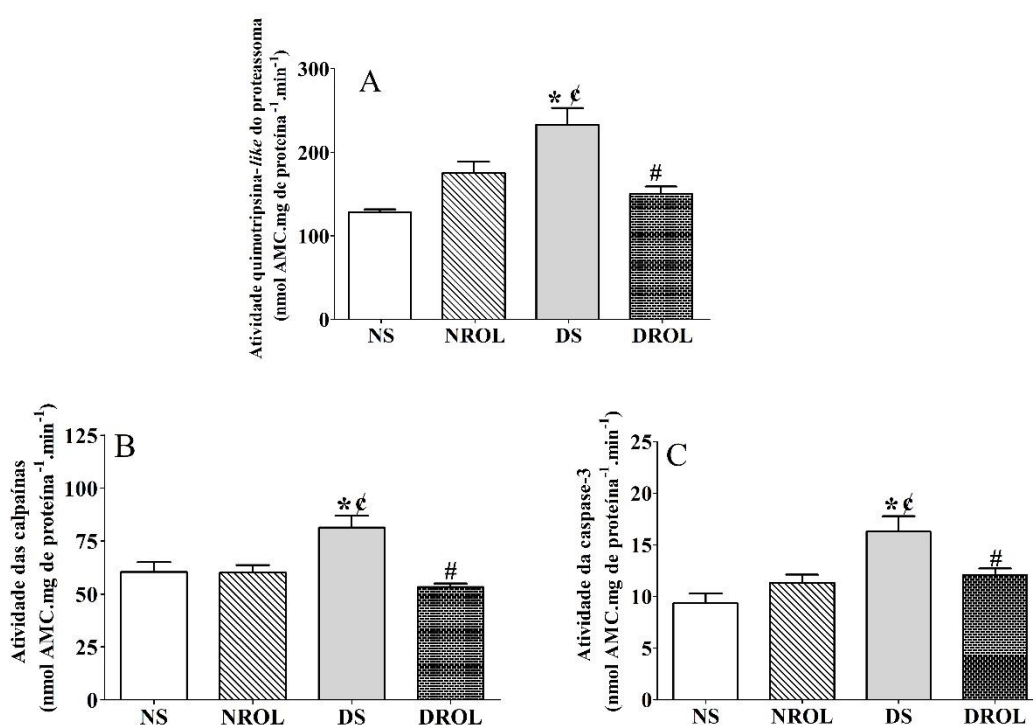
As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ϕ , diferença com NROL; #, diferença com DS.

Na Figura 19 encontram-se os valores médios das atividades quimotripsina-like do proteassoma (A), de calpaínas (B) e de caspase-3 (C) em músculos EDL de animais normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram. Tal como observado em músculos *soleus*, a atividade do proteassoma foi 66% maior em EDL de ratos diabéticos DS em relação aos valores de ratos NS (Figura 19A). Já a atividade do proteassoma em EDL de

ratos diabéticos DROL foi 36% menor quando comparada ao grupo DS, alcançando valores semelhantes aos animais normais.

Animais diabéticos DS apresentaram aumentos nas atividades das calpaínas (35%) e de caspase-3 (74%) em músculos EDL, quando comparados aos valores observados em animais NS (Figura 19B e C, respectivamente). As atividades das calpaínas e de caspase-3 em EDL de animais diabéticos DROL foram menores (34 e 25%, respectivamente), em relação aos valores em EDL de ratos DS, alcançando valores semelhantes aos observados em EDL de animais NS.

Figura 19: Atividades quimotripsina-like do proteassoma (A), de calpaínas (B) e de caspase-3 (C) (nmol AMC.mg proteína⁻¹.min⁻¹) em músculos EDL de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.

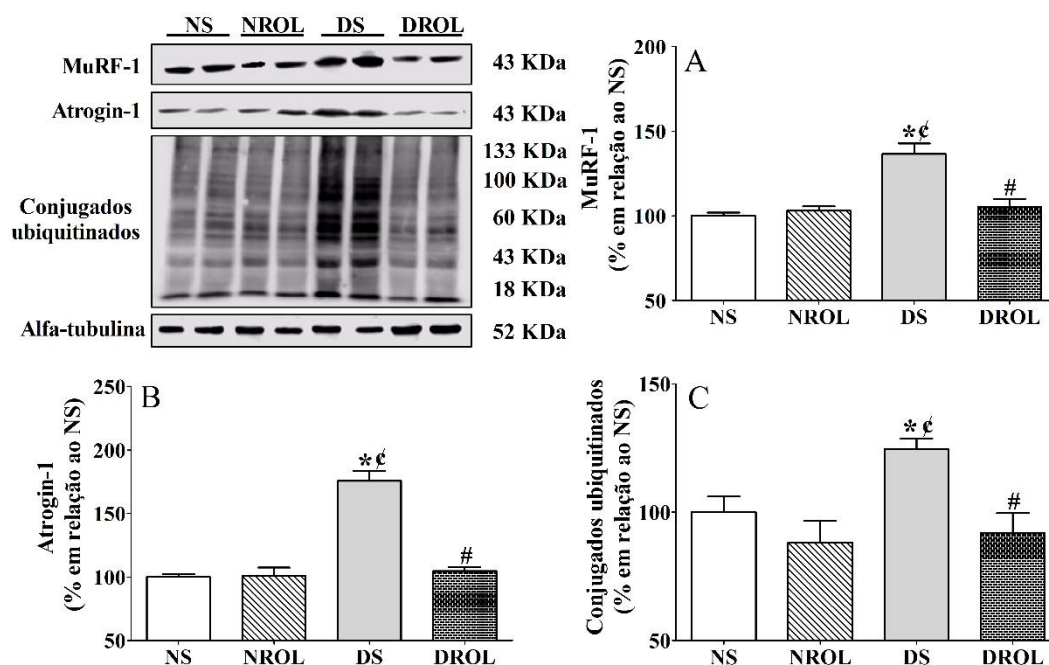


As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ¢, diferença com NROL; #, diferença com DS.

Na Figura 20 encontram-se os níveis de MuRF-1 (A), atrogin-1 (B) e conjugados ubiquitinados (C) em músculos EDL de animais normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram. Animais diabéticos DS apresentaram um aumento de 36% nos níveis de MuRF-1 (Figura 20A) e de 75% nos níveis de atrogin-1 (Figura 20B) em músculos EDL, em relação aos valores em EDL de animais normais NS. Pode-se observar que o tratamento de animais diabéticos com rolipram (DROL) promoveu uma redução na expressão de MuRF-1 (23%) e de atrogin-1 (59%) em músculos EDL em relação ao grupo DS, alcançando valores semelhantes aos observados em animais normais NS.

Houve um aumento de 24% nos níveis de conjugados ubiquitinados em EDL de ratos DS e relação aos animais NS. O tratamento de ratos diabéticos com rolipram (DROL) foi capaz de promover uma redução de 26% nos níveis de conjugados ubiquitinados em EDL, quando comparado aos valores encontrados em DS, alcançando níveis semelhantes aqueles observados em EDL de ratos NS (Figura 20C).

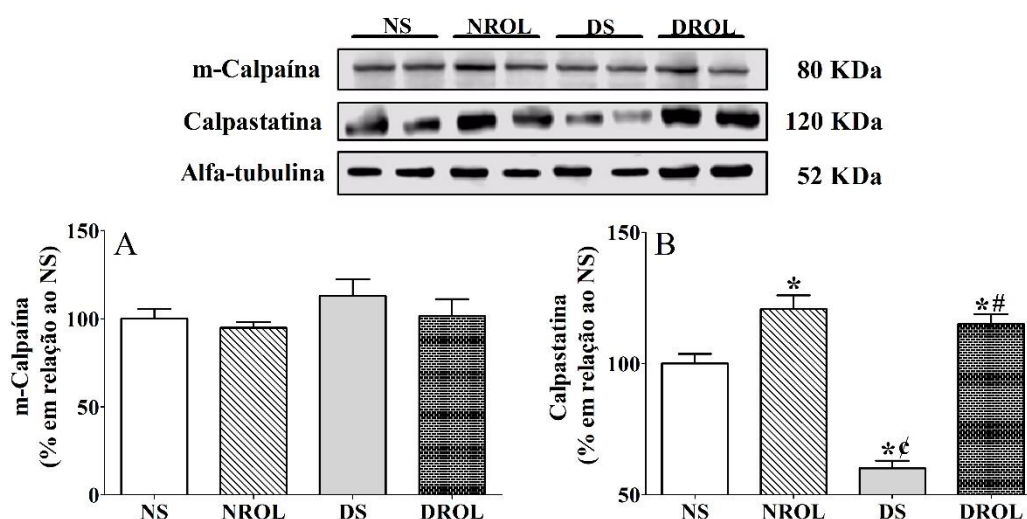
Figura 20: Níveis proteicos de MuRF-1 (A), atrogin-1 (B) e conjugados ubiquitinados (C) em músculos EDL de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ϕ, diferença com NROL; #, diferença com DS.

Na Figura 21 encontram-se os resultados relacionados aos níveis proteicos de m-calpaína (A) e calpastatina (B) em EDL de ratos normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram. Não existem diferenças nos níveis de m-calpaína em músculos EDL de animais quando comparados todos os grupos experimentais estudados (Figura 21A). Em relação aos níveis de calpastatina, uma redução de 40% foi observada em EDL de ratos diabéticos DS, o que pode contribuir para explicar o aumento observado na atividade das calpaínas neste grupo. Já o tratamento de ratos diabéticos com rolipram foi capaz de prevenir completamente esta redução nos níveis de calpastatina (Figura 21B).

Figura 21: Níveis proteicos de m-calpaína (A) e calpastatina (B) em músculos EDL de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.



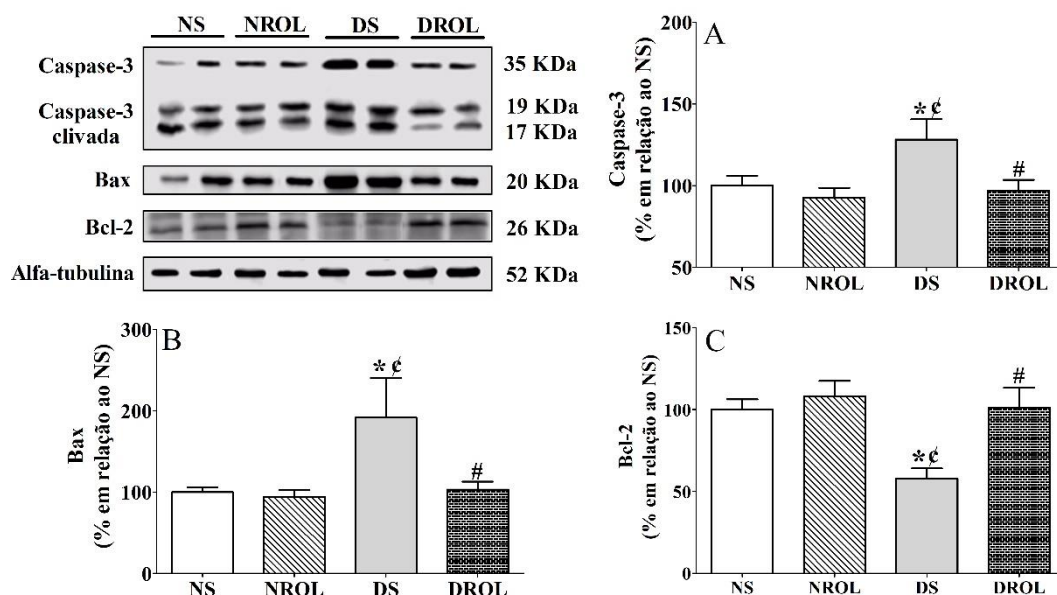
As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ϕ, diferença com NROL; #, diferença com DS.

Na Figura 22 estão apresentados os resultados relacionados aos níveis proteicos de caspase-3 (A), Bax (B) e Bcl-2 (C) em EDL de ratos normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram. Não existem diferenças nos níveis de caspase-3 em músculos EDL de ratos normais tratados com salina ou rolipram. Houve um aumento de 28% nos níveis de caspase-3 em EDL de animais diabéticos DS em relação aos valores observados em EDL de animais NS (Figura 22A), o que pode corroborar os achados relacionados ao aumento observado na atividade da protease. Animais DROL apresentaram uma redução de 24% nos níveis de caspase-3 em EDL, quando

comparados aos valores em DS (Figura 22A); este achado pode explicar, pelo menos em parte, a redução observada na atividade de caspase-3 em EDL de animais DROL.

Animais diabéticos DS apresentaram um aumento nos níveis de Bax de 91% e redução nos níveis de Bcl-2 de 42%, em relação aos valores de animais NS (Figura 22B e C, respectivamente). Tais alterações observadas em animais diabéticos nos níveis de Bax e Bcl-2 foram completamente prevenidas após o tratamento com rolipram.

Figura 22: Níveis de proteicos de caspase-3 (A), Bax (B) e Bcl-2 (C) em músculos EDL de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.

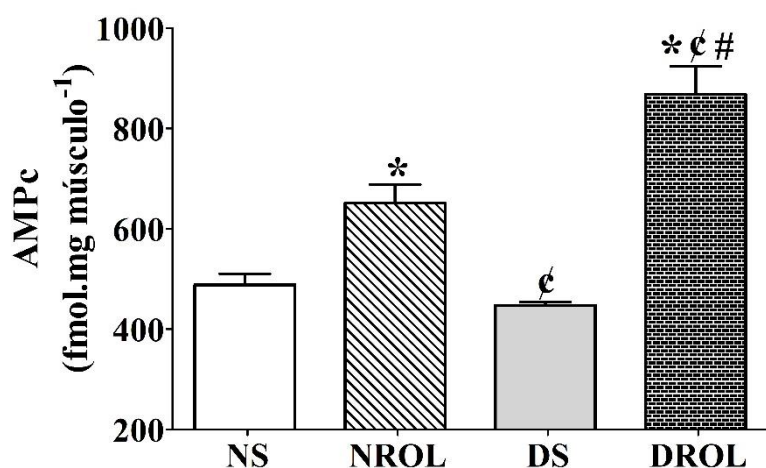


As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ϕ, diferença com NROL; #, diferença com DS.

Na Figura 23 encontram-se os resultados relacionados aos níveis de AMPc em EDL de ratos normais e diabéticos tratados com salina ou rolipram. Não foram observadas diferenças no conteúdo de AMPc em músculos EDL de ratos normais e diabéticos tratados com salina (NS vs DS). O tratamento de ratos normais e diabéticos com rolipram (NROL e DROL) promoveu um aumento de 37 e 83%, respectivamente, no conteúdo de AMPc em EDL quando comparados aos valores de NS (Figura 23).

Interessante observar que aumento observado no conteúdo de AMPc em EDL de animais DROL foi 33% maior quando comparado aos valores no grupo NROL.

Figura 23: Níveis de AMPc em músculos EDL de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ç, diferença com NROL; #, diferença com DS.

Na Figura 24 estão representados os resultados referentes às alterações nos níveis proteicos e/ou níveis de fosforilação de substratos de PKA (A), CREB (B), EPAC1 (C), AKT (D), FoxO1 (E) e FoxO3a (F) em músculos EDL de ratos normais ou diabéticos tratados com rolipram. Os níveis de substratos fosforilados de PKA foram 21% menores em EDL de animais diabéticos DS quando comparados aos valores do grupo NS. O tratamento de ratos normais com rolipram promoveu um aumento de 39% nos níveis de substratos fosforilados de PKA em músculos EDL em relação aos animais NS, enquanto que animais diabéticos tratados com rolipram apresentam um aumento de 22% quando comparados aos valores em DS (Figura 24A), alcançando valores semelhantes aos animais NS.

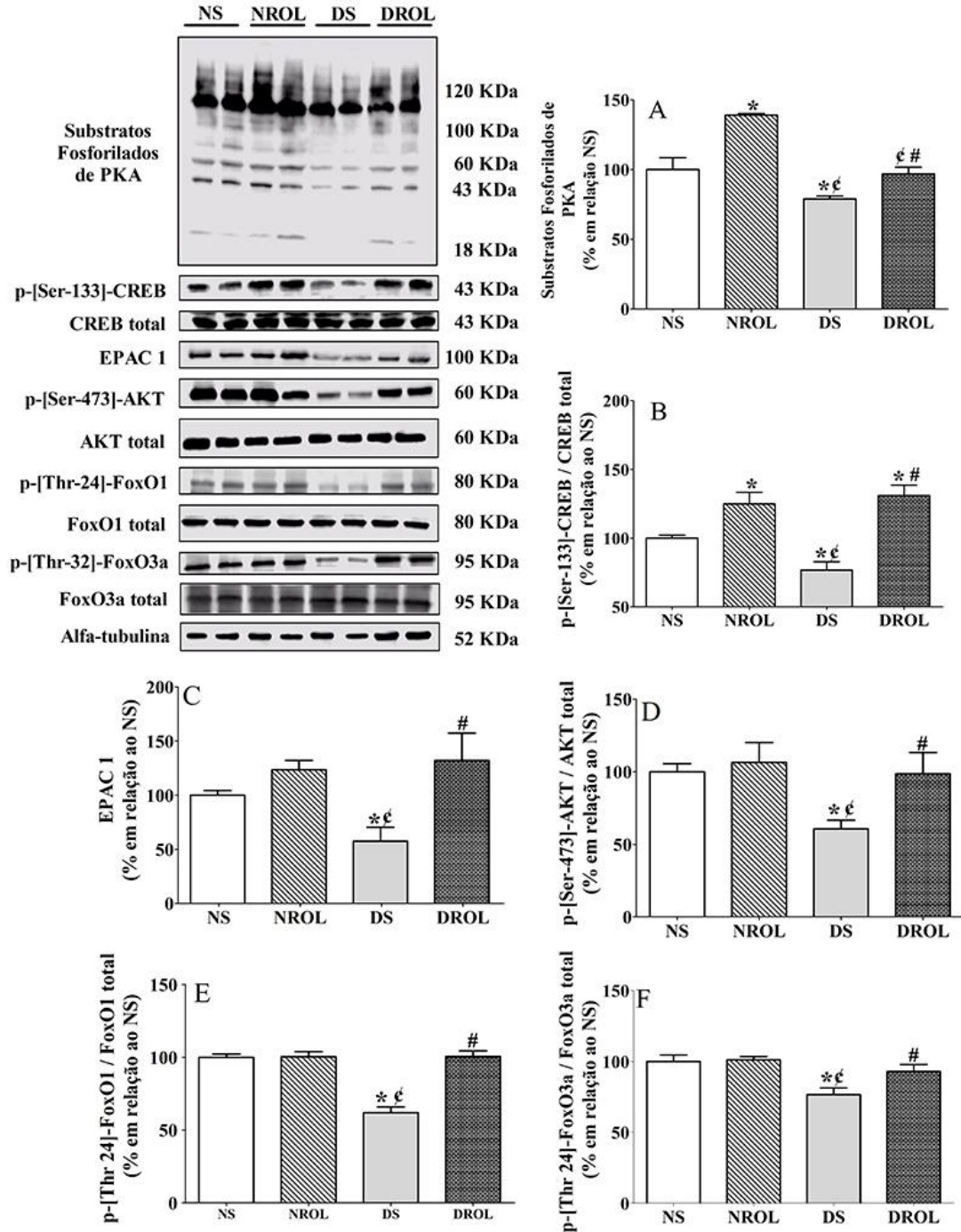
Os níveis de fosforilação de CREB em músculos EDL de ratos diabéticos DS foram 25% menores quando comparados aos valores do grupo NS (Figura 24B). O tratamento de animais normais e diabéticos com rolipram promoveu aumentos de 29 e 27%, respectivamente, nos níveis de fosforilação de CREB, quando comparados aos valores em NS (Figura 24B).

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de EPAC em EDL de ratos normais tratados com salina ou rolipram (Figura 24C). Houve uma redução de 42% nos níveis de EPAC em EDL de animais diabéticos DS quando comparados aos valores encontrados no grupo NS. Tal como observado em músculos *soleus*, animais diabéticos tratados com rolipram (DROL) apresentaram um aumento de 229% nos níveis de EPAC em músculos EDL, quando comparados aos valores encontrados no grupo DS (Figura 24C).

Houve uma redução de 39% na fosforilação de AKT em EDL de ratos diabéticos DS, quando comparados aos valores encontrados no grupo NS (Figura 24C). O tratamento de animais diabéticos com rolipram (DROL) promoveu um aumento de 162% nos níveis de fosforilação de AKT em músculos EDL, quando comparados aos valores obtidos com o grupo DS (Figura 24D).

Pode-se observar que os níveis de fosforilação de FoxO1 (Figura 24E) e de FoxO3a (Figura 24F) foram reduzidos em EDL de ratos diabéticos DS (38 e 23%, respectivamente), quando comparados aos valores no grupo NS. O tratamento de ratos diabéticos com rolipram promoveu aumentos na fosforilação de FoxO1 e de FoxO3a, alcançando níveis semelhantes aos observados em ratos normais tratados com salina ou rolipram (Figuras 24E e F, respectivamente).

Figura 24: Níveis proteicos e/ou de fosforilação de substratos de PKA (A), CREB (B), EPAC1 (C), AKT (D), FoxO1 (E) e FoxO3a (F) em músculos EDL de ratos normais e diabéticos após 3 dias de tratamento com salina ou 2 mg/kg de rolipram.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ϕ, diferença com NROL; #, diferença com DS.

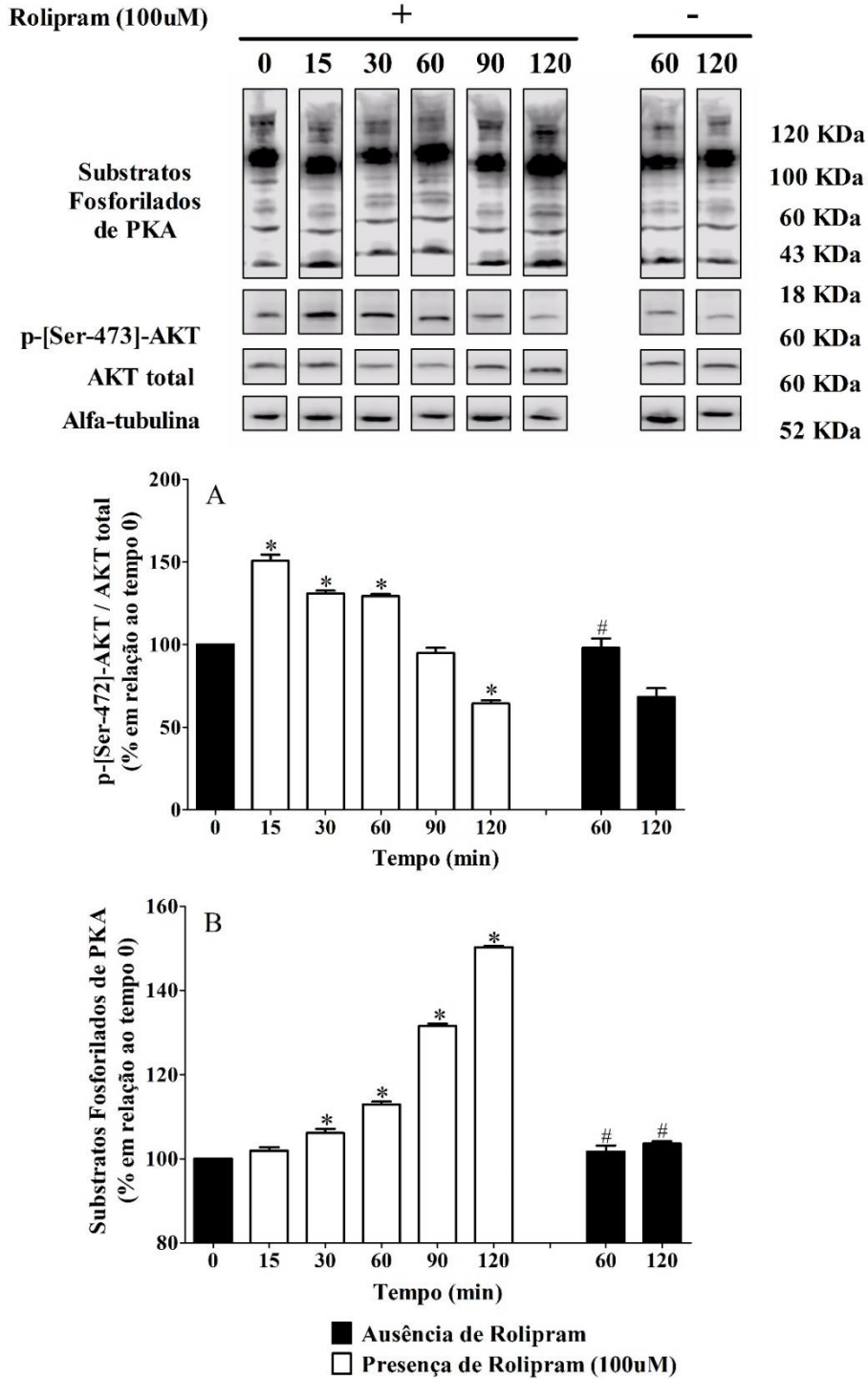
5.1.4. Avaliação do efeito direto do rolipram e de agonistas de PKA e EPAC em músculos EDL de animais normais e diabéticos

Na Figura 25 estão representados os resultados referentes às alterações nos níveis de fosforilação de AKT (A) e de substratos de PKA (B) em músculos EDL de ratos normais incubados na ausência ou na presença de rolipram (100 μ M), em diferentes tempos. Os níveis de fosforilação de AKT foram 50, 30 e 29% maiores nos tempos 15, 30 e 60 minutos de incubação, respectivamente, quando comparados com o tempo 0 (Figura 25A). Os músculos controle (incubados na ausência de rolipram) após 60 minutos de incubação apresentavam níveis de fosforilação de AKT menores em relação aos incubados na presença de rolipram por 60 minutos. Após 90 minutos de incubação com rolipram, os níveis de fosforilação de AKT foram semelhantes aos valores observados no tempo 0, enquanto que após 120 minutos, os músculos apresentaram uma redução de 35% na fosforilação de AKT (Figura 25A).

Os níveis de substratos fosforilados de PKA estavam aumentados nos músculos EDL de animais normais incubados com rolipram nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos, com aumentos de 6, 12, 31 e 50%, respectivamente, quando comparados aos níveis de músculos no tempo 0. Os músculos controle, após incubações de 60 e 120 minutos, não apresentaram nenhuma alteração nos níveis de substratos fosforilados de PKA em relação aos músculos no tempo 0 (Figura 25B).

Analisando estes dados em conjunto, assim como músculos *soleus*, optou-se pela realização dos experimentos *ex vivo* com músculos de animais normais e diabéticos incubados com rolipram ou com agonistas de PKA e EPAC durante 1 hora.

Figura 25: Níveis de fosforilação de AKT (A) e de substratos de PKA (B) de músculos EDL de ratos normais incubados na ausência e presença de rolipram (100 μ M) em diferentes tempos.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença em relação ao tempo 0; #, diferença em relação ao mesmo tempo na presença de rolipram.

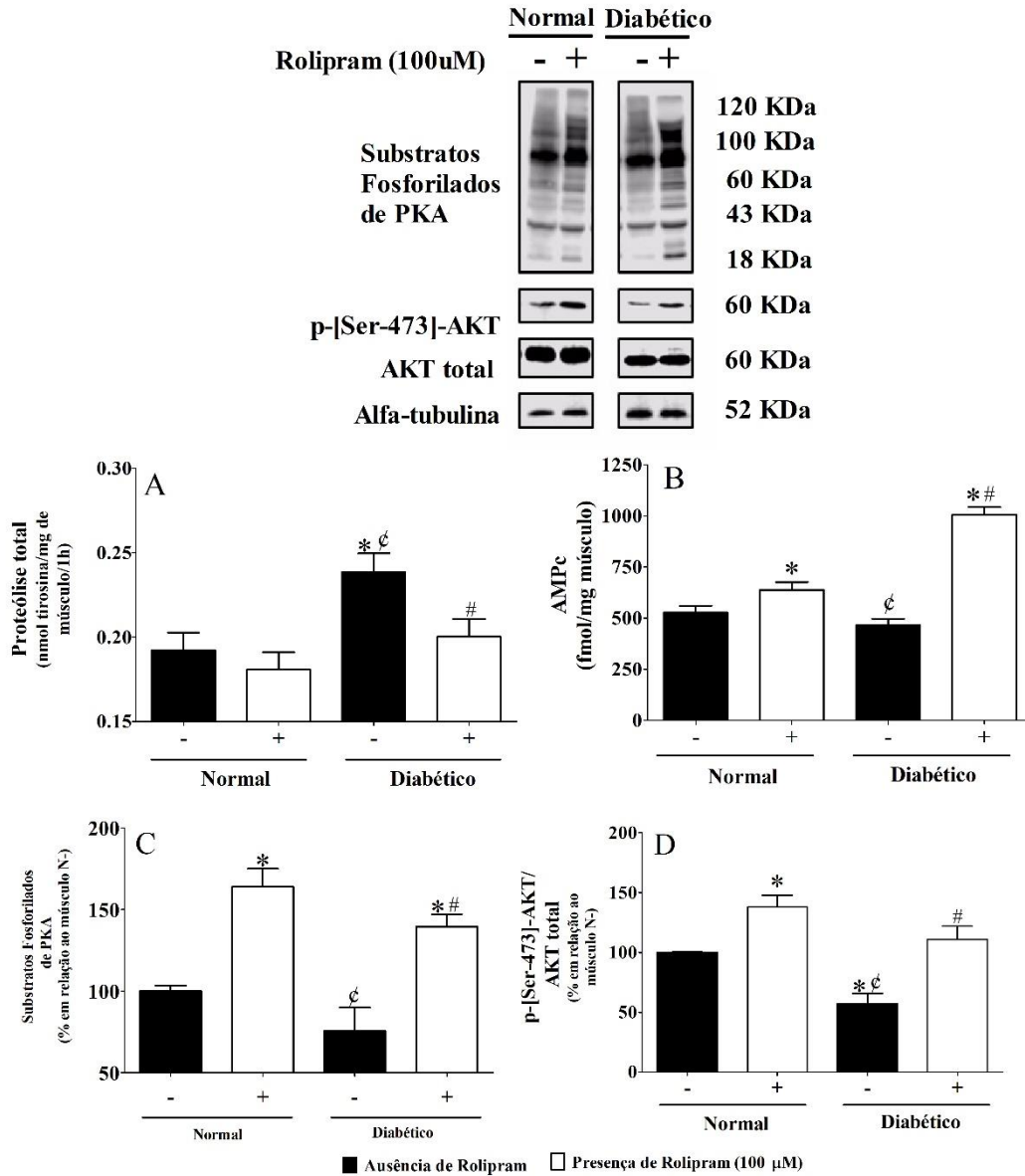
Na figura 26 estão apresentados os resultados de proteólise total (A), conteúdo de AMPc (B), e níveis de fosforilação de substratos de PKA (C) e de fosforilação de AKT (D) em músculos EDL de ratos normais e diabéticos incubados na ausência ou na presença de rolipram (100 μ M).

Houve um aumento de 20% na velocidade de proteólise total em músculos EDL de animais diabéticos incubados na ausência de rolipram, em relação aos valores observados em EDL de animais normais também incubados na ausência de rolipram. Músculos EDL de animais normais incubados na ausência ou na presença de rolipram apresentaram valores de proteólise total semelhantes entre si, enquanto que a incubação na presença de rolipram promoveu uma redução de 12% na proteólise total em músculos EDL de animais diabéticos (Figura 26A).

Músculos EDL de animais normais e diabéticos incubados na ausência de rolipram apresentaram conteúdos de AMPc basais e semelhantes entre si (Figura 26B). Após a incubação com rolipram, os conteúdos de AMPc estavam aumentados (22 e 88%, respectivamente) em músculos EDL de animais normais ou diabéticos, quando comparados aos músculos incubados na ausência do fármaco.

Músculos EDL de animais normais e diabéticos incubados na ausência de rolipram apresentaram níveis de fosforilação de substratos de PKA (Figura 26C) e de fosforilação de AKT (Figura 26D) semelhantes entre si. A incubação com rolipram promoveu aumentos nos níveis de fosforilação dos substratos de PKA de 63 e 39%, respectivamente, em músculos de animais normais e diabéticos, em relação aos valores em músculos de animais normais incubados na ausência de rolipram (Figura 26C). Os níveis de fosforilação de AKT aumentaram 38 e 11%, respectivamente, em músculos EDL de animais normais e diabéticos incubados na presença de 100 μ M de rolipram, em relação aos níveis em músculos de animais normais incubados na ausência do fármaco.

Figura 26: Proteólise total (A), conteúdo de AMPc (B), níveis de fosforilação de substratos de PKA (C) e de fosforilação de AKT (D) de músculos EDL de ratos normais e diabéticos incubados na ausência e presença de rolipram (100 μ M).

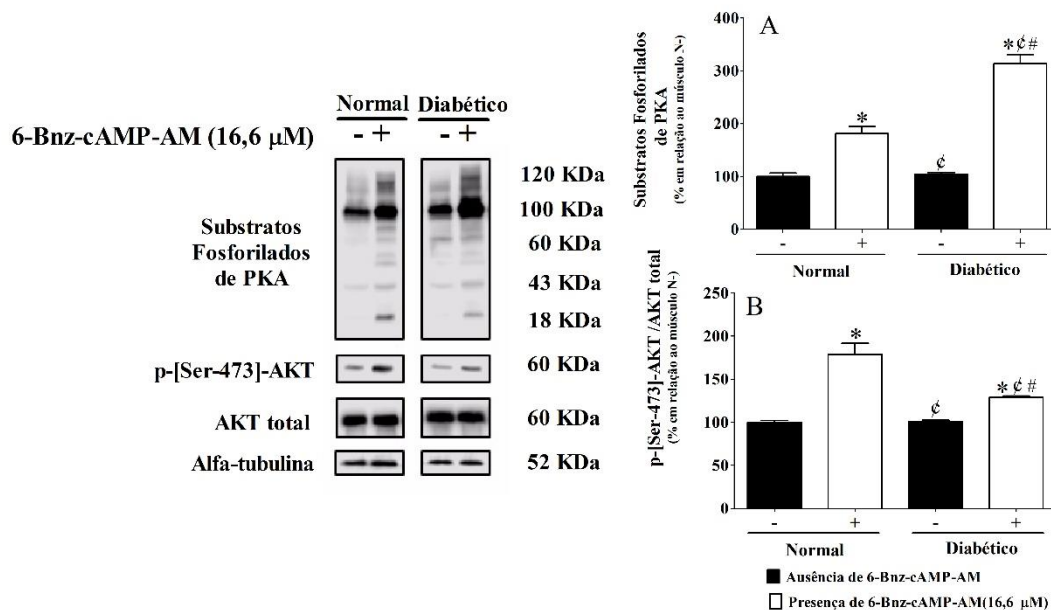


As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com músculos de animais normais na ausência de Rolipram; ϕ , diferença com músculos de animais normais na presença de Rolipram; #, diferença com músculos de animais diabéticos na ausência de Rolipram.

Na Figura 27 estão apresentados os níveis de fosforilação de substratos de PKA (A) e de fosforilação de AKT (B) em músculos EDL de ratos normais e diabéticos

incubados na ausência ou na presença de 6-Bnz-cAMP-AM (agonista de PKA). Incubações na ausência de 6-Bnz-cAMP-AM não promoveram alterações nos níveis de fosforilação de PKA em EDL de ratos normais ou diabéticos (Figura 27A). A incubação de EDL de ratos normais e diabéticos na presença de 6-Bnz-cAMP-AM promoveu aumentos de 81 e 213%, respectivamente, na fosforilação de substratos de PKA, quando comparados aos valores observados em músculos de animais normais incubados na ausência do agonista. As incubações de músculos EDL de animais normais ou diabéticos com 6-Bnz-cAMP-AM promoveram aumentos na fosforilação de AKT, de 78 e 28%, respectivamente (Figura 27B). Músculos de ratos normais ou diabéticos incubados na ausência do agonista apresentaram valores de fosforilação de AKT basais e semelhantes entre si.

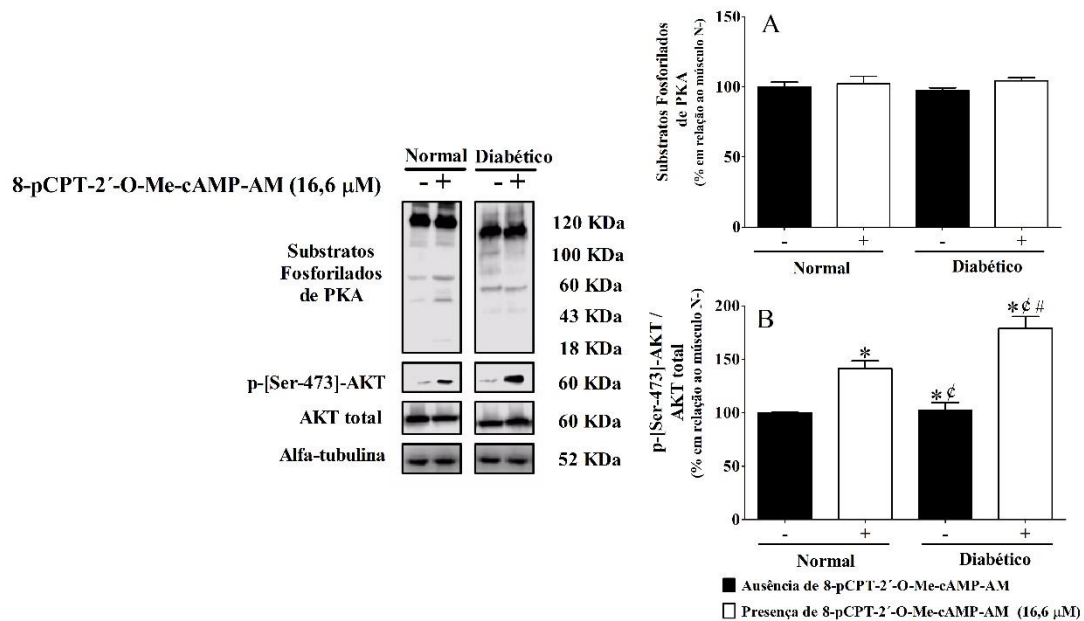
Figura 27: Níveis de fosforilação de substratos de PKA (A) e de fosforilação de AKT (B) de músculos EDL de ratos normais e diabéticos incubados na ausência e presença de 6-Bnz-cAMP-AM (agonista de PKA, 16,6 μ M).



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com músculos de animais normais na ausência de 6-Bnz-cAMP-AM; ζ , diferença com músculos de animais normais na presença de 6-Bnz-cAMP-AM; #, diferença com músculos de animais diabéticos na ausência de 6-Bnz-cAMP-AM.

Na Figura 28 estão apresentados os níveis de fosforilação de substratos de PKA (A) e de fosforilação de AKT (B) em músculos EDL de ratos normais e diabéticos incubados na ausência ou na presença de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM (agonista de EPAC). Músculos EDL controles, incubados na ausência de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM, não apresentaram alterações nos níveis de fosforilação de AKT. Incubações de músculos EDL de ratos normais e diabéticos na presença de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM promoveram aumentos de 41 e 79%, respectivamente, na fosforilação de AKT. (Figura 28B). Os níveis de fosforilação de substratos de PKA não foram alterados em músculos de normais e diabéticos incubados na ausência ou na presença de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM (Figura 28A).

Figura 28: Níveis de fosforilação de substratos de PKA (A) e de fosforilação de AKT (B) de músculos EDL de ratos normais e diabéticos incubados na ausência e presença de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM (agonista de EPAC, 16,6 μ M).

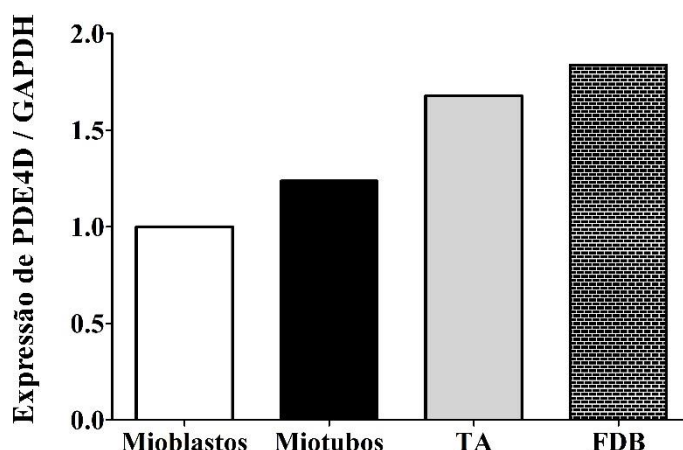


As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com músculos de animais normais na ausência de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM; ϕ , diferença com músculos de animais normais na presença de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM; #, diferença com músculos de animais diabéticos na ausência de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM.

5.2. Experimento II: Avaliação do papel de PDE4D no controle do sistema autofágico-lisossomal em músculos de camundongos alimentados ou jejuados

A Figura 29 apresenta os resultados da expressão de PDE4D em culturas celulares (mioblastos e miotubos) e nos músculos esqueléticos TA e FDB de camundongos. Podemos observar que a PDE4D é expressa nos diferentes níveis de diferenciação da célula muscular, permitindo assim a continuação dos experimentos com transfecção do SiRNA para PDE4D e compreender o papel desta proteína no controle do processo autofágico-lisossomal em músculos esqueléticos.

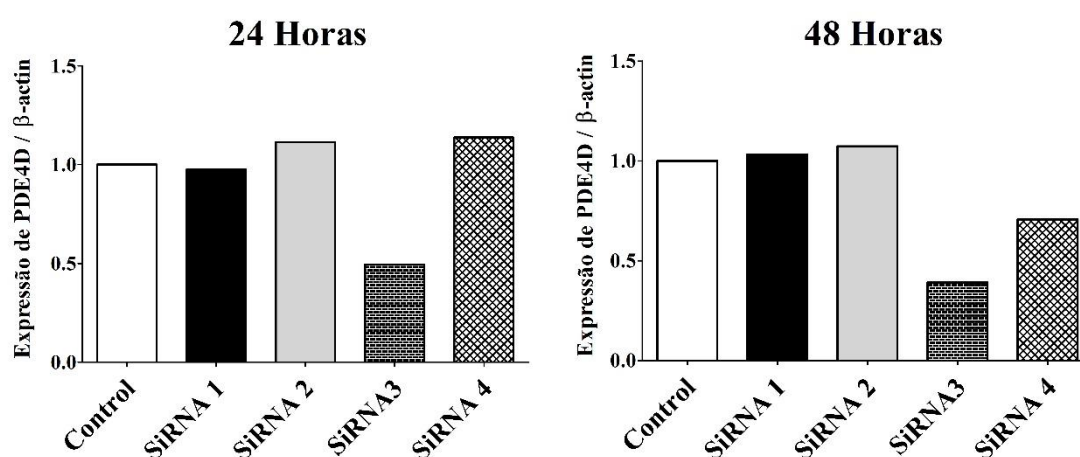
Figura 29: Expressão de PDE4D em diferentes níveis de diferenciação da célula muscular (mioblastos e miotubos) e em músculos esqueléticos de camundongos (TA e FDB).



Na Figura 30 estão apresentados os resultados relacionados à expressão de PDE4D em células mioblasticas após 24 e 48 horas dos tratamentos com os diferentes SiRNAs construídos para o silenciamento da PDE4D. Os SiRNA 1 e 2 não promoveram o silenciamento de PDE4D em mioblastos, após 24 ou 48 horas, quando comparados aos controles transfectados com vetor controle. O SiRNA 4, apesar de não apresentar silenciamento com 24 horas, após 48 horas promoveu silenciamento da PDE4D de aproximadamente 30%, quando comparado ao controle. O SiRNA 3 promoveu

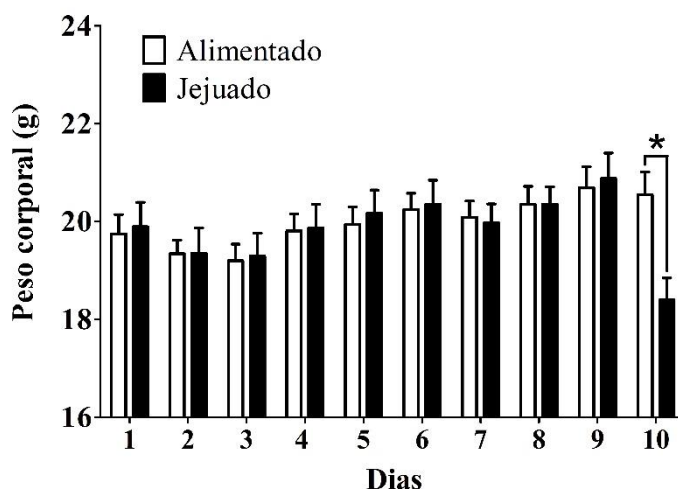
silenciamento de PDE4D de 50 e 60% em 24 e 48 horas, respectivamente, quando comparado ao controle. Estes resultados indicam que os SiRNA 3 e 4 são capazes de silenciarem a PDE4D e assim possibilitando os testes em experimentos *in vivo*. No entanto, vale destacar que os experimentos foram conduzidos apenas com o SiRNA 3.

Figura 30: Expressão de PDE4D em cultura de mioblastos após transfecção com vetor controle ou diferentes SiRNA para PDE4D, após 24 e 48 horas.



Na Figura 31 estão apresentados os valores médios de peso corporal de camundongos após a eletroporação com vetor controle, na pata esquerda, ou SiRNA para PDE4D, na pata direita, durante 10 dias de acompanhamento. Observamos que o procedimento cirúrgico realizado, com a eletroporação em músculos TA e FDB, não promoveu alterações no ganho de peso corporal até o 9º dia de acompanhamento, momento quando os animais do grupo jejuado foram submetidos ao jejum de 24 horas. No 10º dia, os animais do grupo jejuado apresentaram uma redução de 10% nos valores de peso corporal, quando comparados aos animais do grupo alimentado. O peso de animais tratados com colchicina, alimentados ou jejuados, foram agrupados à media dos animais não tratados, por não apresentarem diferenças em comparação ao seu grupo correspondente.

Figura 31: Peso corporal médio de camundongos durante 10 dias, após a eletroporação de músculos com vetor controle e SiRNA para PDE4D. No dia 9, os animais do grupo jejuado foram submetidos ao jejum por 24 horas.

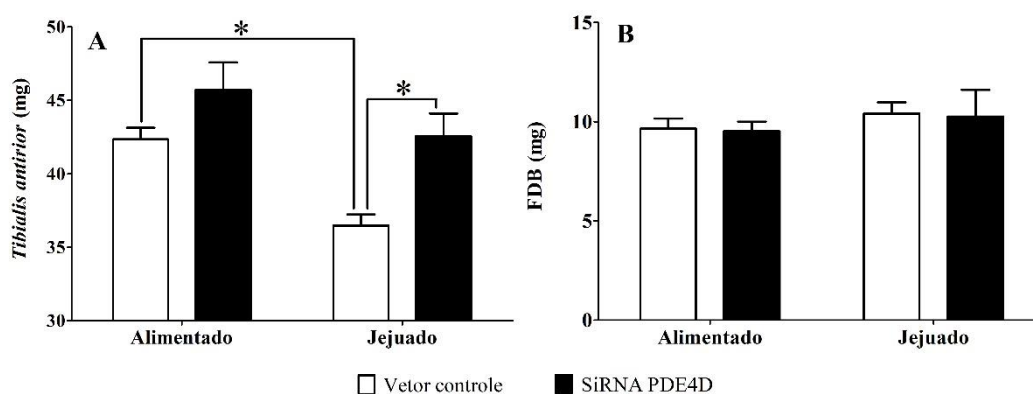


As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$ e representadas com *.

A Figura 32 estão apresentados os valores médios das massas dos músculos esqueléticos TA (A) e FDB (B) de camundongos jejuados ou alimentados, após 10 dias de eletroporação com vetor controle, na pata esquerda, ou SiRNAs para PDE4D, na pata direita. Não foram observadas alterações nas massas dos músculos FDB eletroporados com vetor controle ou com SiRNA para PDE4D, tanto em animais alimentados quanto jejuados por 24 horas (Figura 32B). Músculos TA de animais jejuados, eletroporados com vetor controle, apresentaram uma redução de aproximadamente 14% na massa do músculo, quando comparados aos valores do grupo alimentado (Figura 32A). Embora os músculos TA de animais alimentados e que foram eletroporados com SiRNA para PDE4D tivessem apresentado um aumento de 5% na massa muscular, esse aumento não foi estatisticamente diferente em relação aos músculos eletroporados com vetor controle (Figura 32A). Animais jejuados e que foram eletroporados com SiRNA para PDE4D apresentaram uma proteção na perda de massa muscular de TA, em relação aos músculos eletroporados com o vetor controle. Vale ressaltar que animais jejuados e eletroporados com SiRNA para PDE4D apresentaram valores de massa de TA semelhantes aos músculos eletroporados com vetor controle de animais alimentados (Figura 32A). As massas dos músculos de animais tratados com colchicina, alimentados

ou jejuados, foram agrupados à media dos valores de animais não tratados, por não apresentarem diferenças em comparação ao seu grupo correspondente.

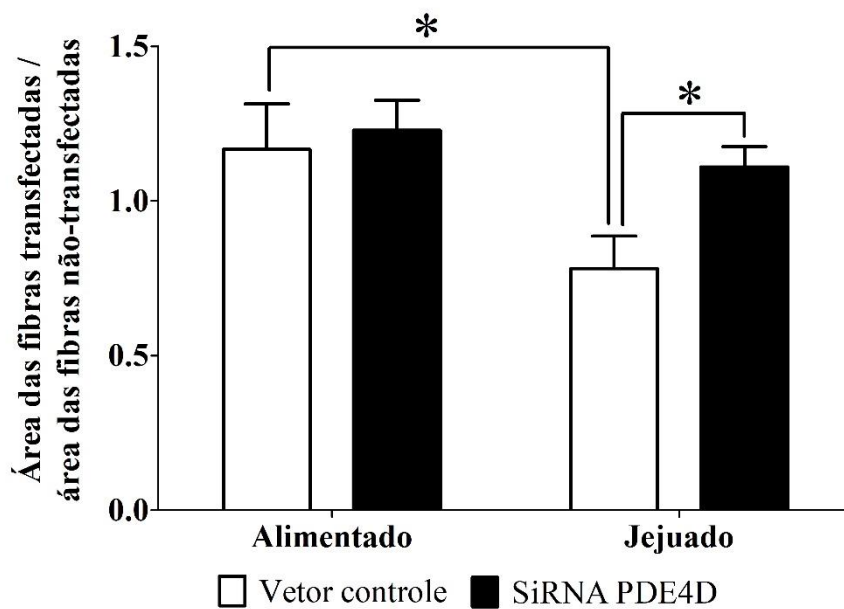
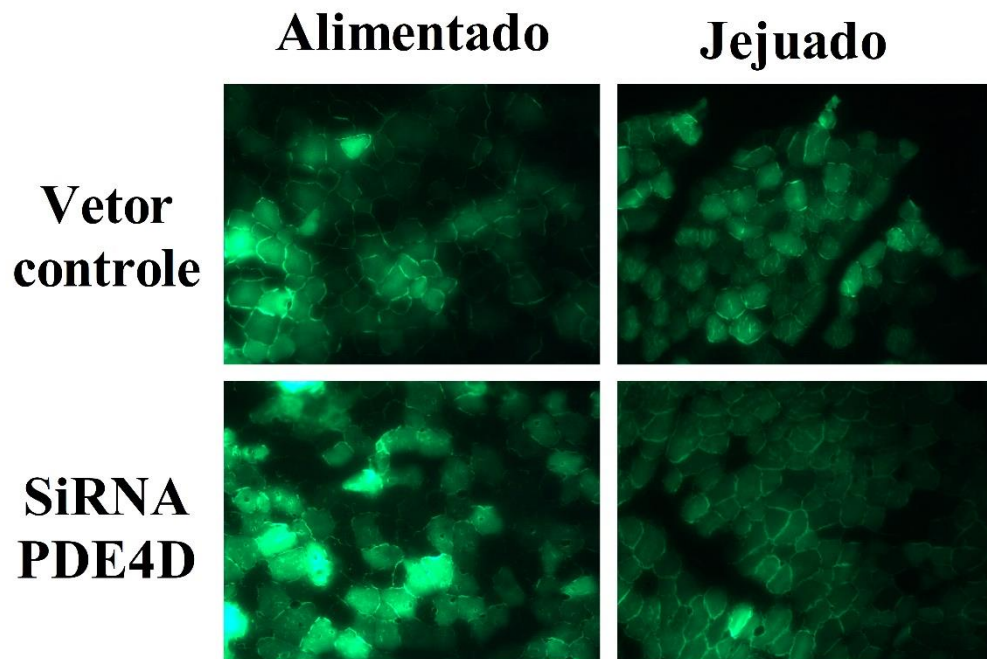
Figura 32: Massa de músculos TA (A) e FDB (B) eletroporados com vetor controle ou com SiRNA para PDE4D em animais alimentados ou submetidos ao jejum de 24 horas.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$ e representadas com *.

Na Figura 33 estão apresentados os resultados relacionados à área da fibras transfectadas com vetor controle ou com SiRNA para PDE4D / área da fibra não transfectada, de animais alimentados ou jejuados por 24 horas. Tal como observado com a massa do músculo TA (Figura 30A), houve uma redução (21%) na área das fibras musculares de animais jejuados e que foram eletroporados com vetor controle, em relação aos valores de animais alimentados e eletroporados com o mesmo vetor. Músculos TA eletroporados com o SiRNA para PDE4D de animais jejuados por 24 horas apresentaram uma proteção na redução da área da fibra, apresentando valores semelhantes aos músculos eletroporados com vetor controle de animais alimentados. As áreas das fibras musculares do grupo alimentado e que foram eletroporados com vetor controle com ou SiRNA para PDE4D não apresentaram diferenças significativas entre si. As áreas das fibras dos músculos de animais tratados com colchicina, alimentados ou jejuados, foram agrupadas às médias dos animais não tratados, por não apresentarem diferenças em comparação ao seu grupo correspondente.

Figura 33: Área das fibras transfectadas com vetor controle ou SiRNA para PDE4D / área de fibras não transfectadas de músculos TA de animais alimentados ou submetidos ao jejum de 24 horas.

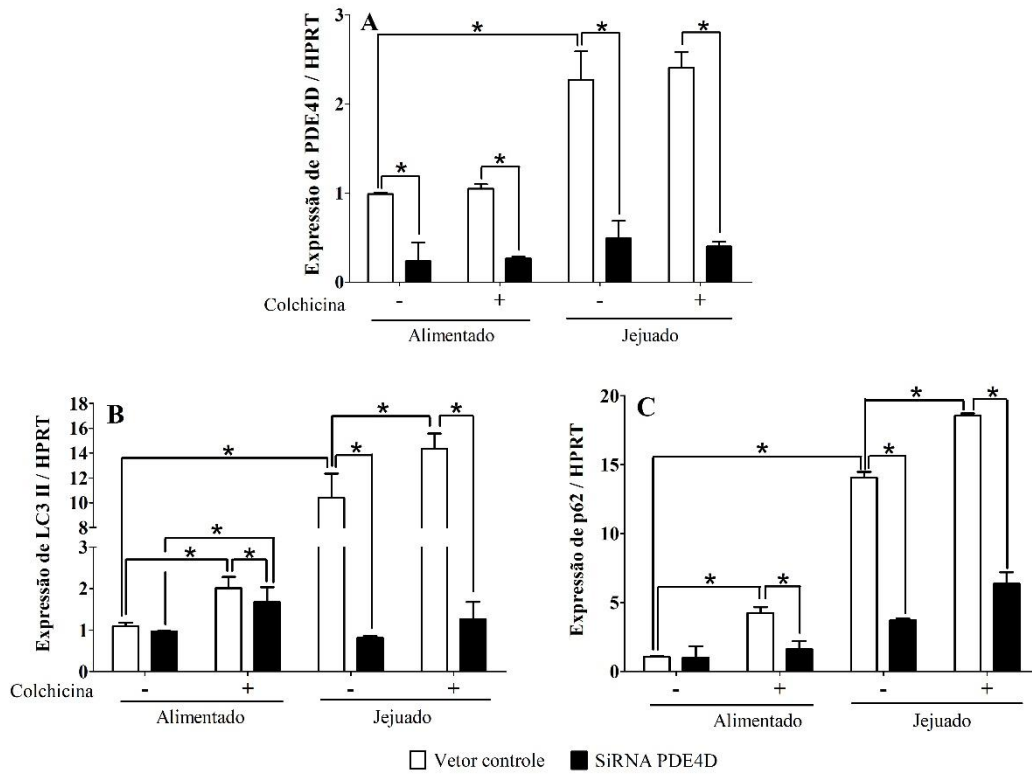


As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$ e representadas com *.

Na Figura 34 estão apresentados os resultados da análise da expressão gênica de PDE4D (A), LC3II (B) e p62 (C) de músculos FDB de animais alimentados e submetidos ao jejum de 24 horas, e que foram eletroporados com vetor controle ou com SiRNA para PDE4D. A expressão de PDE4D (Figura 34A) foi significativamente reduzida em todos os músculos FDB de animais alimentados ou jejuados e que foram eletroporados com o SiRNA para PDE4D. A expressão de PDE4D foi aumentada 2,2 vezes nos músculos FDB de animais jejuados e eletroporados com vetor controle, quando comparados aos músculos de animais alimentados e eletroporados com o mesmo vetor. A expressão de LC3II não foi alterada nos músculos FDB de animais alimentados e que foram eletroporados com vetor controle ou com SiRNAs para PDE4D (Figura 34B), porém o tratamento com colchicina promoveu um aumento na expressão de LC3II, em ambos os músculos. Músculos FDB de animais jejuados e eletroporados com vetor controle tiveram um aumento de 10 vezes na expressão de LC3II, quando comparados aos músculos de animais alimentados e eletroporados com o mesmo vetor. Músculos eletroporados com SiRNA para PDE4D de animais jejuados apresentaram uma redução (92%) na expressão de LC3II quando comparados aos valores em músculos que foram eletroporados com vetor controle (Figura 34B).

A expressão da p62 (Figura 34C) não foi alterada nos músculos de animais alimentados que não receberam colchicina, independentemente se eletroporados com vetor controle ou com SiRNA para PDE4D. O tratamento com colchicina promoveu aumento na expressão da p62 nos músculos FDB de animais alimentados e que foram eletroporados com vetor controle, enquanto que os músculos FDB eletroporados com SiRNA para PDE4D não apresentaram alterações na expressão de p62, quando comparados aos músculos controle (eletroporados com vetor controle) de animais alimentados. Músculos de animais jejuados e eletroporados com vetor controle apresentaram um aumento de 14 vezes na expressão de p62 em relação aos músculos de animais alimentados com o mesmo vetor. O tratamento de animais jejuados com colchicina promoveu um aumento de 30% na expressão da p62 em músculos eletroporados com vetor controle, mas os músculos eletroporados com SiRNA para PDE4D apresentaram uma redução na expressão de p62 de aproximadamente 70%, quando comparado ao músculo eletroporado com vetor controle do mesmo grupo jejuado.

Figura 34: Expressão gênica de PDE4D (A), LC3II (B) e p62 (C) em músculos FDB de animais alimentados ou submetidos ao jejum de 24 horas e após 10 dias da eletroporação com vetor controle ou com SiRNA para PDE4D.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$ e representadas com *.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com o desenvolvimento deste estudo indicam que o tratamento de ratos diabéticos com inibidores de PDE, pentoxifilina, PTX (inibidor não-seletivo de PDE) e rolipram, ROL (inibidor seletivo de PDE 4) é capaz de prevenir ou atenuar a perda de massa muscular esquelética típica de animais em situação de deficiência insulínica, bem como é capaz de reduzir as atividades proteolíticas do proteossoma, calpaínas e caspase-3 em *soleus* e EDL de ratos diabéticos. As reduções nas atividades de caspase-3 e calpaínas podem estar associadas, pelo menos em parte, à diminuição nos níveis proteicos de caspase-3 (PTX e ROL) e Bax (componente pró-apoptótico, ROL) e ao aumento nos níveis de Bcl-2 (componente anti-apoptótico, ROL) e calpastatina (inibidor das calpaínas, PTX e ROL). Os tratamentos com PTX ou ROL também foram capazes de promover, na musculatura esquelética de ratos diabéticos, aumento no conteúdo de AMPc, e este aumento pode estar relacionado à inibição da enzima PDE (PTX). PTX e ROL também foram capazes de promover aumento nos níveis de EPAC (PTX e ROL), bem como aumento na fosforilação de AKT (PTX e ROL) e de fatores de transcrição FoxO (ROL), que em conjunto podem ter relação com a redução na expressão de atrogenes (MuRF-1 e atrogin-1) e subsequente diminuição na ubiquitinação de proteínas e na degradação de substratos pelo proteossoma. Nossos resultados também mostraram que o tratamento de ratos diabéticos com ROL foi capaz de promover ativação de PKA, uma vez que houve uma maior fosforilação de substratos de PKA e do fator de transcrição CREB em músculos esqueléticos. O silenciamento de PDE4D em músculos TA também foi capaz de atenuar a perda de massa e da área de fibras musculares em jejum de 24 horas, em paralelo a uma diminuição na expressão de LC3-II e p62 em músculos FDB. Em conjunto, estes resultados sugerem fortemente a participação das fosfodiesterases do AMPc no controle da proteólise muscular esquelética, permitindo assim que inibidores de PDE possam ser uma opção interessante para a atenuação de atrofia muscular em situações onde a proteólise muscular esteja acelerada.

A cada dia crescem as evidências sobre o papel do AMPc no controle do metabolismo proteico muscular, bem como do potencial farmacológico de inibidores de PDE na promoção de respostas antiproteolíticas na musculatura esquelética. Desta maneira, a promoção do aumento nas concentrações de AMPc via uso de inibidores de

PDE surge como um campo extremamente promissor para atenuar a perda de massa muscular em condições patológicas (Berdeaux e Stewart, 2012; Dutt et al., 2015). Nossos resultados relacionados ao tratamento de ratos diabéticos com 25 mg/kg de PTX ou 2 mg/kg de ROL, por 3 dias, demonstram que estes inibidores de PDE foram capazes de promover aumentos nos níveis intracelulares de AMPc muscular, tanto em *soleus* (Anexo IV – **Figura 4B** e Figura 12) quanto em EDL (Anexo IV – **Figura 4B** e Figura 23), enquanto que animais normais e diabéticos tratados com salina apresentaram níveis de AMPc basais e semelhantes entre si. Uma vez que a atividade de PDE foi drasticamente reduzida tanto em *soleus* quanto em EDL de ratos tratados com PTX (Anexo IV– **Figura 4A**), e considerando que ambos os fármacos têm ações inibitórias sobre PDE, podemos sugerir que os aumentos observados nos níveis de AMPc muscular estejam associados à redução na atividade de PDE.

Aumentos nos níveis de AMPc também foram observados tanto em músculos *soleus* (Figura 15B) quanto em EDL (Figura 26B) incubados na presença 100 μ M de ROL. Assim, o uso de inibidores de PDE parece ser uma estratégia efetiva na promoção dos aumentos nos níveis de AMPc na musculatura esquelética e assim contribuir para a redução na velocidade de degradação de proteínas em condições onde a perda de massa muscular esteja presente, sugerindo assim que os fármacos PTX e ROL têm potencial na prevenção ou atenuação da perda de massa muscular em condições de atrofia.

Estudos têm sugerido que um dos mecanismos que estão envolvidos na inibição da proteólise muscular após aumentos nas concentrações de AMPc envolve a ativação de AKT, proteína quinase efetora das ações antiproteolíticas da insulina (Baviera et al. 2010; Joshi et al., 2014), e a integração entre AMPc e AKT parece ser dependente da proteína EPAC. Nossos achados demonstraram que animais diabéticos tratados com PTX ou ROL apresentaram, em *soleus* e EDL, aumentos nos níveis de EPAC (ANEXO IV – **Figura 4C** e Figuras 13C e 24C) e na fosforilação de AKT em resíduos de aminoácidos relacionados à ativação desta quinase, Ser-473 (ANEXO IV – **Figura 4E** e Figuras 13D e 24D) e Thr- 308 (ANEXO IV – **Figura 4D**). Vale a pena destacar que os níveis proteicos de EPAC e de fosforilação de AKT estão diminuídos em *soleus* e EDL de ratos diabéticos em relação aos ratos normais, tal como anteriormente observado (Baviera et al., 2008). Podemos sugerir que uma menor síntese e/ou uma maior degradação da proteína EPAC estejam ocorrendo em músculos de animais diabéticos. Já a menor fosforilação de AKT em músculos de animais diabéticos pode ser atribuída aos

níveis séricos de insulina reduzidos (Figura 3B). Assim, o tratamento de ratos diabéticos com PTX ou ROL pode ter tido papel importante no estímulo à síntese e/ou prevenção da degradação de EPAC em músculos esqueléticos. Já o aumento nos níveis de fosforilação de AKT observados em músculos de ratos diabéticos após os tratamentos com PTX ou ROL podem ter relação com os maiores níveis circulantes de insulina (tratamento com ROL, Figura 3B). No entanto, não pode ser descartada a possibilidade desta ativação de AKT ter sido uma consequência direta dos efeitos do ROL sobre esta quinase, uma vez que músculos incubados na presença de ROL (Figura 15D e 26D) ou de agonista de EPAC (Figura 17B e 28B) foram capazes de promover aumento nos níveis de fosforilação de AKT.

Corroborando nossos resultados, Ohnuki et al. (2014) observaram que a hipertrofia de músculos *masseter* induzida pelo tratamento de camundongos *wild-type* com clenbuterol era inibida em animais *knockout* para EPAC1. Os autores também observaram nos animais *knockout* para EPAC1 e tratados com clenbuterol, uma diminuição na fosforilação de AKT em resíduos de serina 473, bem como das proteínas *ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K1)* e *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1)*, estes importantes no controle da síntese proteica.

Recentemente, Ohnuki et al. (2016) também observaram, em camundongos *knockout* para EPAC1, respostas distintas relacionadas ao efeito hipertrófico do clenbuterol, ao estudarem os impactos em músculos com fibras de contração rápida (TA) e de contração lenta (*soleus*). Os autores observaram que músculos TA de camundongos *wild-type* tratados com clenbuterol apresentaram um aumento na massa muscular, enquanto que em animais *knockout* para EPAC1 este efeito foi abolido. Interessante ressaltar que músculos *soleus* de animais *wild-type* ou *knockout* para EPAC1 não apresentaram diferenças na massa muscular após os tratamentos com clenbuterol. Os autores demonstraram que o mecanismo responsável pelas diferentes respostas anabólicas encontradas nos músculos *soleus* e TA está relacionada a um aumento de 12 vezes na expressão de PDE4D em *soleus*, que eficazmente reduzia as concentrações de AMPc devido ao tratamento com clenbuterol, prevenindo assim a ativação de AKT. Estes achados apoiam nossos resultados, onde a inibição de PDE promovida pelos tratamentos com PTX ou ROL atenuaram a perda de massa de músculos *soleus* (fibras de contração lenta) e EDL (fibras de contração rápida), via

promoção de respostas antiproteolíticas, preservando a massa muscular no quadro de atrofia promovido pelo diabetes mellitus estreptozotocínico.

Uma vez fosforilada e ativada, a AKT promove a fosforilação e inibição de fatores de transcrição do tipo *forkhead box O* 1 e 3 (FoxO1 e FoxO3), e consequentemente ocorre a redução na transcrição dos atrogenes (MuRF-1 e atrogin-1), que são responsáveis pela ubiquitinação de proteínas a serem degradadas pelo proteassoma (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004). Nossos resultados mostraram que músculos *soleus* e EDL de animais diabéticos tratados com salina apresentaram uma redução na fosforilação de FoxO1 (Figuras 13E e 24E) e FoxO3a (Figuras 13F e 24F) e um aumento nos níveis proteicos de MuRF-1 (ANEXO IV – **Figura 2B** e Figuras 9A e 20A) e atrogin-1 (ANEXO IV – **Figura 2A** e Figuras 9B e 20B), em relação aos animais normais tratados com salina. Estudos relacionados à compreensão dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da atrofia muscular no diabetes mellitus têm relatado o importante papel da via PI3K/AKT/FoxO no controle da expressão de MuRF-1 e atrogin-1 na atividade do UPS, acarretando na perda de massa muscular devido ao aumento da proteólise (Sala e Zorzano, 2015; Rom e Reznick, 2016).

Nossos achados indicam que, em músculos *soleus* e EDL de ratos diabéticos tratados com ROL, ocorre um aumento na fosforilação de FoxO1 (Figuras 13E e 24E, respectivamente) e de FoxO3a (Figuras 13F e 24F, respectivamente), bem como uma diminuição na expressão de MuRF-1 (Figuras 9A e 20A, respectivamente) e de atrogin-1 (Figuras 9B e 20B, respectivamente). Redução nos níveis de atrogenes também foi observada em músculos *soleus* e EDL de animais diabéticos tratados com PTX (ANEXO IV – **Figura 2A e B**). Estes resultados explicam, pelo menos em parte, a capacidade antiproteolítica dos inibidores de PDE (PTX e ROL), inibindo o sistema UPS, uma vez que *soleus* e EDL de ratos diabéticos tratados com PTX ou ROL apresentaram também redução nos níveis dos conjugados ubiquitinados (ANEXO IV – **Figura 2C** e Figuras 9C e 20C, respectivamente) e na atividade quimotripsina-*like* do proteassoma (ANEXO IV – **Figura 2D** e Figuras 8A e 19A, respectivamente).

Corroborando com nossos achados, Baviera et al. (2007) demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com PTX promoveu uma redução nas velocidades de proteólise total e da via proteolítica ubiquitina-proteassoma em músculos EDL. Além disso, Lira et al. (2011) também observaram uma redução na velocidade da via proteolítica ubiquitina-proteassoma após a incubação de músculos EDL na presença de

ROL, bem como verificaram um aumento nas concentrações de AMPc e diminuição na expressão de atrogin-1 e MuRF-1. Desta forma, nossos resultados indicam que um dos possíveis mecanismos através dos quais inibidores de PDE (PTX e ROL) desempenham suas respostas antiproteolíticas parece ser dependente de aumento nos níveis de AMPc, ativação de AKT (provavelmente via estimulação de EPAC) e subsequente inibição de fatores de transcrição FoxO1 e FoxO3a, e assim redução na expressão de atrogenes e ativação do proteassoma. Porém, não podemos descartar a possibilidade de que esta ativação de AKT após os tratamentos com inibidores de PDE (pelo menos em relação ao ROL) seja uma consequência de redução nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias, em especial TNF- α (Figura 4A); há evidências de que citocinas inflamatórias participam do estabelecimento de atrofia muscular via inibição de AKT, tal como será discutido posteriormente.

O aumento na atividade do UPS é crucial para o estabelecimento de quadros de perda de massa muscular em diversas situações atroficas (Attaix et al., 2008; Murton et al., 2008; Bonaldo e Sandri, 2013; Talbert et al., 2013). Embora a maioria dos estudos tenha como enfoque a busca por estratégias que inibam o UPS para evitar ou atenuar a perda de massa muscular durante condições catabólicas, deve-se enfatizar que o proteassoma é incapaz de degradar miofibrilas intactas (Solomon e Goldberg, 1996). Além disso, as proteínas miofibrilares constituem aproximadamente 55-60% das proteínas musculares, em peso (Neti et al., 2009). Assim, a prévia dissociação das miofibrilas é um passo limitante para o processo de ubiquitinação de proteínas miofibrilares e subsequente degradação pelo proteassoma. Estudos têm demonstrado que, em situações de atrofia muscular, tanto caspase-3 quanto as calpaínas parecem estar envolvidas na desmontagem do sarcômero e liberação de substratos a serem ubiquitinados e em seguida degradados pelo proteassoma (Du et al. 2004; Lee et al. 2004; Goll et al., 2008).

Nossos resultados mostram que houve um aumento nas atividades de caspase-3 (ANEXO IV – **Figura 3A** e Figuras 8C e 19C) e das calpaínas (ANEXO IV – **Figura 3B** e Figuras 8B e 19B) em *soleus* e EDL de ratos diabéticos em relação aos valores observados em animais normais, o que pode explicar o subsequente aumento no conteúdo de conjugados ubiquitinados (ANEXO IV – **Figura 2C** e Figura 9C e 20C, respectivamente) e na proteólise mediada pelo proteassoma (ANEXO IV – **Figura 2D** e Figuras 8A e 19A, respectivamente). O aumento na atividade de caspase-3, tanto em

soleus quanto em EDL de ratos diabéticos, pode ser atribuído, pelo menos em parte, ao aumento observado na expressão desta proteína (ANEXO IV – **Figura 3C** e Figuras 11A e 22A).

A proteólise mediada por caspase tem sido associada ao processo de apoptose, que pode ser regulada por alterações na composição das proteínas Bcl-2 (anti-apoptótica) e Bax (pró-apoptótica). A Bcl-2 é uma das proteínas que atua no controle da cascata de eventos de ativação sequencial das caspases, inibindo caspases iniciadoras e efetoras, enquanto que Bax altera a permeabilidade da membrana mitocondrial, estimulando o processo apoptótico (Earnshaw et al., 1999; Crompton, 2000; Rossi e Gaidano, 2003; Karbowski et al., 2006). O aumento nos níveis da proteína pró-apoptótica Bax (Figuras 11B e 22B), em conjunto com a redução nos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Figuras 11C e 22C) em músculos *soleus* e EDL de ratos diabéticos, em conjunto podem explicar o aumento observado na atividade de caspase-3 devido ao diabetes. Já o aumento na atividade das calpaínas pode ser atribuído, pelo menos em parte, à redução nos níveis de calpastatina, inibidor endógeno das calpaínas, tanto em *soleus* (ANEXO IV – **Figura 3D** e Figura 10B) quanto em EDL (ANEXO IV – **Figura 3D** e Figura 21B) de ratos diabéticos.

O tratamento de animais diabéticos com PTX ou ROL foi eficaz na redução da atividade de calpaínas (ANEXO IV– **Figura 3B** e Figuras 8B e 19B), em ambos os músculos. Apesar de os níveis proteicos das calpaínas não estarem alterados em nenhum dos grupos experimentais estudados (Figuras 10A e 21A), destaca-se que a redução nos níveis de calpastatina (ANEXO IV – **Figura 3D** e Figuras 10B e 21B) em *soleus* e EDL de animais diabéticos foi prevenida pelos tratamentos com os inibidores de PDE.

Existem evidências de que a sinalização do AMPc é capaz de promover aumento na expressão de calpastatina (Zhang et al., 2005). Salamino et al. (1994) observaram que corações de ratos perfundidos com dibutilil-AMPc apresentavam um aumento nos níveis de calpastatina, e conseqüentemente queda na atividade das calpaínas, sugerindo que a ativação de processos sinalizatórios dependentes deste segundo mensageiro podem levar a um aumento na transcrição gênica da calpastatina e assim culminar em inibição da proteólise mediada por calpaínas.

Há também relatos de que a administração de agonistas β_2 -AR promove uma redução na atividade das calpaínas e um aumento na atividade da calpastatina, respostas estas seguidas de supressão da proteólise dependente das calpaínas (Bardsley et al.,

1992). Gonçalves et al. (2012) demonstraram que o tratamento de ratos normais com clenbuterol durante 3 dias promove um aumento no conteúdo proteico de calpastatina, sem alterações nos níveis das calpaínas 1 e 2. Apesar de os estudos de Baviera et al. (2007) e Lira et al. (2011) demonstrarem que PTX e ROL, respectivamente, também promovem uma redução na velocidade da proteólise dependente de Ca^{2+} (representante da proteólise mediada por calpaínas), tanto em abordagens *in vivo* quanto *ex vivo*, ainda não estava claro os mecanismos através dos quais inibidores de PDE, via aumento do AMPc, desempenhavam este controle. Assim nossos resultados indicam que este controle está relacionado, pelo menos em parte, com a regulação na expressão de calpastatina. Embora existam evidências de que a calpastatina seja fosforilada pela PKA (Salamino et al., 1997; Aversa et al., 1999), Melloni et al. (2006) observaram que a fosforilação da calpastatina por PKA não afeta a capacidade desta proteína em interagir e inibir as calpaínas, reforçando a ideia de que o controle exercido pela sinalização do AMPc sobre a calpastatina seja dependente de transcrição gênica.

Os níveis proteicos de caspase-3 também foram reduzidos em músculos *soleus* (ANEXO IV – **Figura 3C** e Figura 11A) e EDL (ANEXO IV – **Figura 3C** e Figura 22A) de ratos diabéticos tratados com ROL. O tratamento com ROL também preveniu o aumento nos níveis de Bax (Figuras 11B e 22B, respectivamente) e a queda nos níveis de Bcl-2 (Figuras 11C e 22C, respectivamente). Lee et al. (2004) demonstraram que a atividade da caspase-3 é regulada pela sinalização da insulina PI3K/AKT, uma vez que a redução na atividade de PI3K promovida pelo diabetes levou à ativação de caspase-3 e ao aumento na expressão de atrogin-1, explicando a atrofia muscular observada nestes animais.

Li et al. (2014) observaram que o efeito da irradiação à laser de baixa intensidade na proteção da massa muscular esquelética (*gastrocnemius*) de ratos em sarcopenia (18 meses de idade) era mediado via aumento nos níveis de Bcl-2 e diminuição nos níveis de Bax; os autores sugerem que pelo menos parte deste efeito anabólico seja mediado pelo aumento na expressão de SIRT-1, dependente de aumento nos níveis de AMPc e ativação de PKA. Situações que promovem ativação de AKT (aumento nos níveis de fosforilação da quinase), como por exemplo, o tratamento com IGF-1 (Yang et al., 2010) ou a suplementação de animais nefrectomizados (modelo experimental de doença renal crônica, que leva à atrofia muscular) com cetoácidos (Wang et al., 2014), também estão relacionadas com aumento nos níveis de Bcl-2 e/ou

redução nos níveis de Bax, que culminam na prevenção da perda de massa muscular esquelética.

Peng et al. (2018) evidenciaram o efeito do roflumilast (inibidor seletivo de PDE4) sobre processos apoptóticos induzidos por sevoflurano (anestésico inalatório capaz de induzir apoptose em células neurais) em cultura primária de neurônios hipocampais. Os autores demonstraram que neurônios hipocampais tratados com sevoflurano e roflumilast apresentaram um aumento na viabilidade celular e diminuição de morte por apoptose; também houve redução no conteúdo de Bax, caspase-3 e -9 clivadas e aumento no conteúdo de Bcl-2, evidenciando um papel importante da via PDE4/AMPC no controle da expressão de proteínas envolvidas na cascata apoptótica.

Em estudo realizado por Kim e colaboradores (2008), foi demonstrado que a sinalização do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) promove um aumento na transcrição do gene de Bcl-2 em células β -pancreáticas, uma vez que possuem uma região promotora responsiva ao AMPC. Os autores também observaram que a sinalização do GIP promoveu um aumento na fosforilação de CREB e diminuição da fosforilação de TORC2 (*transducer of regulated CREB protein 2*), que dentro do núcleo se complexam e se ligam a região promotora CRE-I de Bcl-2. Assim os autores propõem a via AMPC/PKA/CREB/TORC2 como um possível mediador do processo transcricional da proteína anti-apoptótica Bcl-2.

Outro possível mecanismo pelo qual a sinalização do AMPC pode controlar os processos apoptóticos foi recentemente descrito por Serrano e Hardy (2017), que demonstraram, *in vitro*, que PKA promove a fosforilação de resíduo de serina-183 em caspase-9, fosforilação esta que inibe sua ativação e bloqueia a cascata apoptótica. Esta fosforilação impediu o auto-processamento da caspase-9 e bloqueou diretamente a ligação desta caspase ao seu substrato, bem como promoveu uma alteração conformacional no centro da caspase-9 via rompimento de interações fundamentais, desmontando suas subunidades. Apesar de os autores não terem demonstrado a ação de PKA sobre caspases 3, 6, 7, 8 e 10, eles especulam uma possível ação, uma vez que estas caspases possuem os mesmos sítios de reconhecimento.

A regulação da ativação dos sistemas proteolíticos auxiliares exercidas pela PKA ressalta a importância da via AMPC/PKA como participante do controle da proteólise na musculatura esquelética. A PKA é o principal efetor intracelular que participa da via canônica do AMPC, e quando ativada após aumento nos níveis deste

segundo mensageiro, promove a fosforilação e ativação de diversas proteínas, entre elas o fator de transcrição CREB em resíduos de serina-133, que nesta condição fica ativo e assim promove o aumento na expressão de vários genes (Gonzalez e Montminy, 1989; Lee et al., 1990). Tem sido demonstrado que a fosforilação de CREB por PKA participa na promoção do anabolismo no metabolismo proteico da musculatura esquelética: camundongos submetidos a sessões de exercícios de alta intensidade apresentaram em músculos TA um aumento nos níveis de cálcio intracelular e de fosforilação de CREB, com subsequente ativação de CRCT2 (co-regulador transcricional regulado por CREB, tipo 2), induzindo respostas anabólicas e assim hipertrofia muscular (Bruno et al., 2014).

Nossos resultados indicam que músculos *soleus* e EDL de ratos diabéticos tratados com salina apresentaram uma redução nos níveis de fosforilação de substratos de PKA (Figuras 13A e 24A) e de CREB (Figuras 13B e 24B), podendo assim contribuir, juntamente com a redução nos níveis de insulina, com a perda de massa muscular esquelética nestes animais. Já músculos *soleus* e EDL de animais diabéticos tratados com ROL apresentaram um aumento na fosforilação destas proteínas, o que pode explicar, pelo menos em parte, as respostas relacionadas a menor perda de massa muscular nestes animais. Desta forma, a estimulação da sinalização dependente de AMPc, via inibição de PDE 4, com subsequente aumento na ativação de PKA e CREB, parece ser uma opção interessante para prevenir a perda de massa muscular em condições de atrofia.

Já tem sido relatado que o tratamento de ratos denervados com agonistas β -adrenérgicos, como o clenbuterol, atenua a perda de massa muscular, via redução da atividade do sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} e do UPS, além de reduzir a expressão de catepsina L e dos atrogenes (Gonçalves et al., 2012). Interessante ressaltar que os autores, ao incubarem músculos *soleus* de animais denervados na presença de N6BZ-AMPC (agonista de PKA) observaram respostas semelhantes àquelas do clenbuterol, porém quando os músculos foram incubados com clenbuterol e triciribina (inibidor seletivo de AKT) não houve bloqueio dos efeitos do agonista adrenérgico. Desta forma, os autores concluíram que os efeitos antiproteolíticos promovidos pela sinalização do AMPc via PKA ocorre de forma independente da ativação de AKT. Estes resultados reforçam o papel de PKA no controle dos sistemas proteolíticos, inibindo a expressão de atrogenes, regulando a expressão de Bcl-2 e calpastatina, bem como a

ativação de caspases (Salamino et al., 1994; Zhang et al., 2005; Kim et al., 2008; Serrano e Hardy, 2018; Peng et al., 2018), e por fim, controlando o metabolismo proteico em condições atroficas.

Outro sistema proteolítico importante no metabolismo proteico muscular é o sistema autofágico-lisossomal. O lisossoma tem sido relatado como responsável pelo aumento da degradação de componentes celulares em vários modelos de atrofia muscular (Taillander et al., 1996; Williams et al., 1999; Combaret et al., 2002). Algumas evidências têm demonstrado que a sinalização do AMPc participa no controle das etapas de formação do autofagossoma, bem como na expressão de seus componentes (Graça et al., 2013; Joassard et al., 2013a; Machado et al., 2016). Nossos resultados indicam uma prevenção da perda de massa muscular (Figura 32A) e uma diminuição da área de fibras (Figura 33) de músculos TA de animais submetidos ao jejum de 24 horas e que foram transfectados com SiRNA para PDE4D. Também observamos a diminuição da expressão de LC3b (Figura 32 B) e p62 (Figura 32C) em músculos FDB transfectados com SiRNA para PDE4D. Vale ressaltar que músculos FDB transfectados com SiRNA para PDE4D de animais que foram tratados previamente com colchicina (bloqueador do fluxo autofágico) apresentaram uma redução na expressão destes genes autofágicos, indicando uma diminuição do fluxo autofágico promovida pelo silenciamento de PDE4D.

Diversos estudos têm demonstrado o papel de agonistas β -adrenérgicos na regulação de componentes da via autofágica-lisossomal. Gonçalves et al. (2012) observaram em ratos denervados e tratados com clenbuterol uma redução da atividade da via proteolítica lisossomal em músculos *soleus*, bem como redução na expressão de LC3b e GABARAPI. Machado et al. (2016) também observaram que músculos EDL de animais denervados e incubados na presença do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) tiveram uma redução da proteólise lisossomal e redução nos níveis de mRNA de LC3b, GABARAPI e catepsina L. Em paralelo, CGRP elevou os níveis de AMPc, estimulou a sinalização de PKA/CREB e aumentou a fosforilação de FoxO1 em músculos de animais normais e denervados. Este estudo demonstrou o papel do CGRP exercendo uma ação inibitória direta no sistema autofágico-lisossomal em músculos esqueléticos em condição basal ou em condição de atrofia, via ativação da sinalização de AMPc/PKA/CREB. Estes resultados corroboram nossos achados com o silenciamento de PDE4D em músculos esqueléticos, explicando em parte os

mecanismos que podem estar envolvidos nos achados encontrados, apesar de ainda serem necessários mais estudos para compreender como a inibição da PDE4D pode estar envolvida no controle da autofagia.

A análise em conjunto de todos os nossos resultados evidencia que a inibição das PDE, seja via estratégias farmacológicas (tratamentos com PTX ou ROL) ou via silenciamento gênico (transfecção com SiRNA de PDE4D), promoveu em animais diabéticos ou jejuados uma atenuação da perda de massa muscular, observada em músculos *soleus* (ANEXO IV – **Tabela 1** e Figura 7), EDL (ANEXO IV – **Tabela 1** e Figura 18) ou TA (Figura 32A). Estes resultados são corroborados pelo maior ganho de peso corporal (ANEXO IV – **Tabela 1** e Figura 4) nos experimentos com tratamentos farmacológicos.

Em adição aos benefícios já apresentados nos tratamentos com inibidores de PDE na atrofia muscular induzida pelo diabetes mellitus, observamos que o tratamento com ROL também promoveu uma redução nos níveis glicêmicos (Figura 5A), bem como um aumento nos níveis séricos de insulina (Figura 5B), bem como uma maior tolerância à glicose observada no TTGO (Figura 5C e D).

O modelo de diabetes mellitus estreptozotocínico estabelece-se devido a uma destruição de células β -pancreáticas, por necrose, através de um mecanismo que envolve a alcalinização do DNA e aumento na geração de espécies reativas, tais como ânion superóxido, H_2O_2 , radical hidroxila e óxido nítrico (Szkudelski, 2001). Porém, a administração de STZ não garante uma completa destruição de células β -pancreáticas, tal como observado pelas baixas concentrações séricas de insulina em animais diabéticos tratados com salina (Figura 5B). Desta forma, efeitos benéficos do ROL sobre células β -pancreáticas devem ser considerados. É sabido que a via AMPc/PKA promove a regulação de moléculas-chave envolvidas na secreção de insulina, incluindo GLUT (transportador de glicose) 2, canais de potássio sensíveis ao ATP, canais de cálcio controlados por voltagem, entre outros (Yang e Yang, 2016). Desta forma, células β -pancreáticas remanescentes, após o tratamento com ROL, poderiam ser estimuladas a secretar mais insulina, promovendo assim a redução na glicemia de animais diabéticos, bem como pode participar nas respostas antiproteolíticas musculares.

Torna-se evidente que os maiores níveis séricos de insulina observados em animais diabéticos tratados com ROL poderiam promover as ações antiproteolíticas

observadas na musculatura esquelética, via ativação da via PI3K/AKT. Tal como já descrito, a AKT participa do controle da expressão dos atrogenes e subsequente atividade do proteassoma (Bodine et al., 2001; Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004).

Importante ressaltar que, além de uma resposta antiproteolítica indireta, via estímulo à secreção de insulina, o tratamento com inibidores de PDE também podem promover uma diminuição da resposta inflamatória sistêmica. Sabe-se que o aumento nos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias promovem a ativação do UPS; animais experimentais perdem massa muscular quando tratados com o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Garcia-Martinez et al., 1993; Buck e Chojkier, 1996) ou quando expostos a intervenções que elevam o TNF- α endógeno (por exemplo, sepse ou câncer). Em humanos, o catabolismo muscular tem sido atribuído ao TNF- α em doenças associadas ao aumento de marcadores da inflamação e que incluem câncer (Tisdale, 1999), insuficiência cardíaca congestiva (Anker e Rauchau, 1999), AIDS (Moldawer e Sattler, 1998) e diabetes mellitus (Moller, 2000).

O TNF- α , quando se liga a seu receptor, induz algumas respostas intracelulares que acarretam na ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B), um fator de transcrição (Von Haehling et al., 2002), bem como pode promover um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e na transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL) -6 ou 1 β . Também a sinalização disparada pelo TNF- α estimula a apoptose via interação com o complexo receptor de TNF- α e Fas (Li et al., 1998; Li et al., 1999; Li e Reid, 2000). Vale ressaltar que a estimulação da via TNF- α /NF- κ B tem correlação com o aumento na expressão de atrogenes, em especial MuRF-1 e atrogin-1, sendo suficiente para causar atrofia muscular via ativação do UPS (Cai et al., 2004; Sishi e Engelbrecht, 2011). Também há evidências de que o TNF- α , além de induzir a ativação de caspases, também participa de eventos que culminam em menor ativação de AKT, via atenuação da via PI3K/AKT, e promovendo assim um aumento na proteólise muscular (Sishi e Engelbrecht, 2011).

Nossos resultados mostraram que os tratamentos de ratos diabéticos com inibidores de PDE promoveram redução nos níveis circulantes de TNF- α (ANEXO IV – **Tabela 1** e Figura 6A) e IL-1 β (Figura 6B) em animais diabéticos. Novamente, a ação sistêmica dos inibidores de PDE em células envolvidas nos processos inflamatórios,

como neutrófilos, eosinófilos, monócitos, entre outros, poderiam estar envolvidas nestas respostas (Teixeira et al., 1997).

Inibidores de PDE são supressores eficazes na produção de citocinas por diferentes tipos de celulares (Nicholson et al., 1991; Nicholson e Shahid, 1994), bem como são capazes de reduzirem os níveis séricos de TNF- α em condições patológicas (Sekut et al., 1995; Pettipher et al., 1996). Além de prevenir a secreção de citocinas, os inibidores de PDE bloqueiam a ativação de leucócitos *in vitro*, sendo este um mecanismo importante para explicar alguns dos efeitos anti-inflamatórios dos inibidores de PDE *in vivo* (Teixeira et al., 1997).

Desta forma, os experimentos *ex vivo*, com incubação de músculos *soleus* e EDL com ROL, foram realizados para elucidar os efeitos diretos deste fármaco na musculatura esquelética. Após 1 hora de incubação com ROL, ambos os músculos apresentaram uma redução da proteólise total (Figura 15A e 25A, respectivamente), aumento no conteúdo de AMPc (Figura 15B e 25B, respectivamente) e aumento na fosforilação de substratos de PKA (Figura 15C e 25C, respectivamente) e na fosforilação de AKT (Figura 15D e 25D, respectivamente). Tais achados corroboram os achados *in vivo* e atribuem diretamente ao ROL as respostas antiproteolíticas observadas na musculatura esquelética, e que parecem contar com a participação da via AMPc/AKT.

Na tentativa de elucidar a participação dos efetores ativados por AMPc, EPAC e PKA, nas respostas antiproteolíticas observadas na musculatura esquelética, bem como sugerir um elo através do qual o ROL promove ativação de AKT via aumento de AMPc, experimentos *ex vivo* foram realizados com músculos incubados com os agonistas destas proteínas. Incubações com 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM (agonista de EPAC) promoveram aumento na fosforilação de AKT, em resíduos de serina-473 (Figura 17B e 28B) em *soleus* e EDL de animais normais e diabéticos. Os níveis de substratos fosforilados de PKA não foram alterados após incubação com agonista de EPAC (Figura 17A e 28A). Estes resultados reforçam, mais uma vez, que a via AMPc/EPAC/AKT possui importante papel na promoção das respostas antiproteolíticas deste segundo mensageiro na musculatura esquelética.

Intrigantemente, quando realizamos as incubações de músculos *soleus* (Figura 16) e EDL (Figura 27) de animais normais e diabéticos com 6-Bnz-cAMP-AM (agonista de PKA), músculos *soleus* apresentaram apenas aumento na fosforilação de

substratos de PKA (Figura 16A), sem alteração na fosforilação de AKT (Figura 16B), sugerindo que as respostas antiproteolíticas associadas à ativação de PKA parecem não envolver a ativação de AKT. Entretanto, músculos EDL incubados com 6-Bnz-cAMP-AM apresentaram aumentos tanto na fosforilação de substratos de PKA (Figura 27A) quanto na fosforilação de AKT (Figura 27B). Estes resultados sugerem que músculos com predominância de fibras de contração rápida podem apresentar estímulos à fosforilação de AKT através de duas vias dependentes de AMPc e que envolvem ativação de PKA e EPAC. Contudo, nossos resultados ainda não são suficientes para compreender totalmente os mecanismos através dos quais PKA pode promover a ativação de AKT, ou como a ativação de EPAC também pode culminar em ativação de AKT.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que o tratamento de ratos diabéticos com inibidores de PDE (pentoxifilina e rolipram) promoveram inibição nas atividades do proteassoma, caspase-3 e das calpaínas em músculos esqueléticos *soleus* e EDL, culminando em prevenção da perda de massa muscular esquelética em uma situação de atrofia.

A ação antiproteolítica direta dos inibidores de PDE na musculatura esquelética de ratos diabéticos parece depender da resposta integrada de dois eventos dependentes de aumento nos níveis de AMPc:

i) a via AMPc/PKA/CREB, uma vez que houve um aumento nos níveis de fosforilação de substratos de PKA e de CREB, e esta via pode estar associada ao aumento na transcrição de Bcl-2 (componente anti-apoptótico) e de calpastatina (inibidor de calpaínas), bem como na inibição de caspases via fosforilação, explicando, pelo menos em parte, a redução nas atividades de caspase-3 e de calpaínas, com menor liberação de proteínas da estrutura do sarcômero para serem ubiquitinadas e degradadas pelo proteassoma;

ii) a via AMPc/EPAC/AKT/FoxO, uma vez que houve aumento na expressão de EPAC, na fosforilação de AKT e na fosforilação de fatores de transcrição FoxO, bem como redução na expressão dos atrogenes MuRF-1 e atrogin-1, explicando, pelo menos em parte, a redução nos conjugados poliubiquitinados (que também pode ser uma consequência da menor oferta de substratos devido à redução nas atividades de caspase-3 e calpaínas); por fim, observou-se uma redução na atividade do proteassoma.

Apesar de elucidados os efeitos diretos de inibidores de PDE via estudos *in vivo* e *ex vivo*, não descartamos a possibilidade de ações indiretas destes fármacos e que culminam na inibição da proteólise na musculatura esquelética, via redução da inflamação sistêmica observada pelos níveis diminuídos de TNF- α e IL-1 β e maiores níveis circulantes de insulina.

Os estudos com silenciamento gênico de PDE4D em músculos esqueléticos em condição de jejum demonstraram a atenuação da perda de massa muscular e a regulação de genes autofágicos LC3b e p62, demonstrando um possível envolvimento da sinalização PDE4D/AMPc no controle de processos autofágicos. Porém, apesar da literatura apresentar a via AMPc/PKA como responsável pela regulação de processos

autofágicos durante o uso fármacos β -adrenérgicos, mais estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação destes genes pela PDE.

Em conjunto, concluímos que a inibição de PDE, via estratégias farmacológicas ou por silenciamento gênico, apresenta-se promissora como uma estratégia de inibição da proteólise muscular esquelética em situações catabólicas, regulando a expressão de proteínas participantes de sistemas proteolíticos envolvidos na degradação de proteínas musculares, ressaltando a necessidade de continuidade dos estudos que reforcem os uso de inibidores de PDE como uma opção terapêutica eficaz no tratamento de atrofia musculares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUNIT, K.; SCARABELLI, T.M.; MCCAULEY, R.B. Autophagy in mammalian cells. **World J. Biol. Chem.** v.3, n.1, p.1-6, 2012.
- ALMAHARIQ, M.; TSALKOVA, T.; MEI, F.C.; CHEN, H.; ZHOU, J.; SASTRY, S.K.; SCHWEDE, F.; CHENG, X. A novel EPAC-specific inhibitor suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion. **Mol. Pharmacol.** v.83, n.1, p.122-128, 2013.
- ANKER, S.D.; RAUCHAUS, M. Insights into the pathogenesis of chronic heart failure: immune activation and cachexia. **Curr Opin Cardiol.** v.14, p.211-216, 1999.
- ATTAIX, D.; COMBARET, L.; BÉCHET, D.; TAILLANDIER, D. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy in cachexia. **Curr. Opin. Support. Palliat. Care.** v.2, n4, p.262-266, 2008.
- AVERNA, M.; DE TULLIO, R.; SALAMINO, F.; MELLONI, E.; PONTREMOLI, S. Phosphorylation of rat brain calpastatins by protein kinase C **FEBS Lett.** v.4, p.433-438, 1997.
- BARDSLEY, R.G.; ALLCOCK S.M.; DAWSON J.M.; DUMELOW N.W.; HIGGINS J.A.; LASSLETT Y.V.; LOCKLEY A.K.; PARR T.; BUTTERY P.J. Effect of beta-agonists on expression of calpain and calpastatin activity in skeletal muscle. **Biochimie** v.74, p.267–273, 1992.
- BAVIERA, A.M.; ZANON, N.M.; NAVEGANTES, L.C.; KETTELHUT, I.C. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. **Mol. Cell. Endocrinol.** v.315, p.104-112, 2010.

- BAVIERA, A.M.; ZANON, N.M.; NAVEGANTES, L.C.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT I.C. Chemical sympathectomy further increases muscle protein degradation of acutely diabetic rats. **Muscle Nerve**. v.38, n.2, p.1027-1035, 2008.
- BAVIERA, A.M.; ZANON, N.M.; NAVEGANTES, L.C.; MIGLIORINI R.H.; KETTELHUT I.C. Pentoxifylline inhibits Ca²⁺-dependent and ATP-proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 286, p. E702-E708, 2007.
- BELL, R.A.; AL-KHALAF, M.; MEGENEY, L.A. The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. **Skelet. Muscle**. v.6, p.6-16, 2016.
- BENTO, C.F.; RENNA, M.; GHISLAT, G.; PURI, C.; ASHKENAZI, A.; VICINANZA, M.; MENZIES, F.M.; RUBINSZTEIN, D.C. Mammalian Autophagy: How Does It Work? **Annu. Rev. Biochem.** v.2, n.85, p.685-713, 2016.
- BERDEAUX, R.; STEWART, R. cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.303, p.E1-E17, 2012.
- BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia**. 5ª edição. St. Louis, Missouri: Mosby; Elsevier, 2004.
- BETTS, D.H.; KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**. v.55, n.1, p.171-191, 2001.
- BODINE, S.C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V.K.; NUNEZ, L.; CLARKE, B.A.; POUHEYMIROU, W.T.; PANARO, F.J.; NA, E.; DHARMARAJAN, K.; PAN, Z.Q.; VALENZUELA, D.M.; DECHIARA, T.M.;

- STITT, T.N.; YANCOPOULOS, G.D.; GLASS, D.J. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**. v.294, p.1704-1708, 2001.
- BONALDO, P.; SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Dis. Model. Mech.** v.6, p.25-39, 2013.
 - BORLAND, G.; SMITH, B.O.; YARWOOD, S.J. EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP. **Br. J. Pharmacol.** v.158, p.70-86, 2009.
 - BREUILLÉ, D.; FARGE, M.C.; ROSÉ, F.; ARNAL, M.; ATTAIX, D.; OBLED, C. Pentoxifylline decreases body weight loss and muscle protein wasting characteristics of sepsis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.265, p.E660–E666, 1993.
 - BRUNO, N.E.; KELLY, K.A.; HAWKINS, R.; BRAMAH-LAWANI, M.; AMELIO, A.L.; NWACHUKWU, J.C.; NETTLES, K.W.; CONKRIGHT, M.D. Creb coactivators direct anabolic responses and enhance performance of skeletal muscle **EMBO J.** v.33, n.9, p.1027–1043, 2014.
 - BUCK, M.; CHOJKIER, M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. **EMBO J.** v.15, p.1753-1765, 1996.
 - CAI, D.; FRANTZ, J.D.; TAWA, N.E.JR.; MELENDEZ, P.A.; OH, B.C.; LIDOV, H.G.; HASSELGREN, P.O.; FRONTERA, W.R.; LEE, J.; GLASS, D.J.; SHOELSON, S.E. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell.** v.119, n.2, p.285-298, 2004.
 - CHANG, H.Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of Caspases. **Microbiol Mol Biol Rev.** v.64, n.4, p.821-846, 2000.

- COHEN, S.; NATHAN, J.A.; GOLDBERG, A.L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. **Nat. Rev. Drug. Discov.** v.14, p.58-74, 2015.
- COMBARET, L.; RALLIÈRE, C.; TAILLANDIER, D.; TANAKA, K.; ATTAIX, D. Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing rats. **Mol. Biol. Rep.** v.26, p.95–101, 1999.
- COMBARET, L.; TILIGNAC, T.; CLAUSTRE, A.; VOISIN, L.; TAILLANDIER, D.; OBLED, C.; TANAKA, K.; ATTAIX, D. Torbafylline (HWA 448) inhibits enhanced skeletal muscle ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in cancer and septic rats. **Biochem. J.** v.361, p.185-192, 2002.
- CONTE, T.C.; SILVA, L.H.; SILVA, M.T.; HIRABARA, S.M.; OLIVEIRA, A.C.; CURI, R.; MORISCOT, A.S.; AOKI, M.S.; MIYABARA, E.H. The β 2-adrenoceptor agonist formoterol improves structural and functional regenerative capacity of skeletal muscles from aged rat at the early stages of postinjury. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.** v.67, n.5, p.443-55, 2012.
- COSTELLI, P.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; LLOVERA, M.; CARBÓ, N.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; AGELL, N.; TESSITORE, L.; BACCINO, F.M.; ARGILÉS, J.M. Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. **J. Clin. Invest.** v.95, p.2367–2372, 1995.
- COSTELLI, P.; REFFO, P.; PENNA, F.; AUTELLI, R.; BONELLI, G.; BACCINO, F.M. Ca²⁺-dependent proteolysis in muscle wasting. **Int J Biochem Cell Biol.** v.37, n.10, p.2134-2146, 2005.
- COUX, O.; TANAKA, K.; GOLDBERG, A.L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. **Annu Rev Biochem.** v.65, p.801-847, 1996.

- CROMPTON, M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. **Curr. Opin. Cell. Biol.** v.12, n.4, p.414-419, 2000.
- DE ROOIJ, J.; ZWARTKRUIS F.J.; VERHEIJEN, M.H.; COOL, R.H.; NIJMAN, S.M.; WITTINGHOFER, A.; BOS, J.L. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. **Nature.** v.3, p.474-477, 1998.
- DOUILLARD, A.; GALBES, O.; BEGUE, G.; ROSSANO, B.; LEVIN, J.; VERNUS, B.; BONNIEU, A.; CANDAU, R.; PY, G. Calpastatin overexpression in mice skeletal muscle prevents clenbuterol-induced muscle hypertrophy and phenotypical shift. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** v.39, p.364-372, 2012.
- DU, J.; WANG, X.; MIERELES, C.; BAILEY, J.L.; DEBIGARE, R.; ZHENG, B.; PRICE, S.R.; MITCH, W.E. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. **J. Clin. Invest.** v.113, p.115-123, 2004.
- DUTT, V.; GUPTA, S.; DABUR, R.; INJETI, E.; MITTAL, A. Skeletal muscle atrophy: Potential therapeutic agents and their mechanisms of action. **Pharmacol. Res.** v.2, n.99, p.86-100, 2015.
- EARNSHAW, W.C.; MARTINS, L.M.; KAUFMANN, S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annu. Rev. Biochem.** v.68, p.383-424, 1999.
- ETLINGER, J.D.; GOLDBERG, A.L. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.74, p.54-58, 1977.

- FENG, Y; HE, D.; KLIONSKY, D.J. The machinery of macroautophagy. **Cell. Res.** v.24, n.1, p.24-41, 2014.
- FITTS, R.H. Cellular mechanisms of muscle fatigue. **Physiol Rev.** v.7, v.1, p.49-94, 1994.
- GARCIA-MARTINEZ, C.; LOPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILES, J.M. Acute treatment with tumour necrosis factor-alpha induces changes in protein metabolism in rat skeletal muscle. **Mol Cell Biochem.** v.125, p.11-18, 1993.
- GLASS, D.; ROUBENOFF, R. Recent advances in the biology and therapy of muscle wasting. **Ann N Y Acad Sci.** v.1211, p.25-36, 2010.
- GLICKMAN, M.H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol Rev.** v.82, p.373-428, 2002.
- GOLL, D.E.; DAYTON, W.R.; SINGH, I.; ROBSON, R.M. Studies of the alphaactinin actin interaction in the Z-disk by using calpain. **J Biol Chem.** v.266, n.13, p.8501-10, 1991.
- GOLL, D.E.; NETI, G.; MARES, S.W.; THOMPSON, V.F. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. **J. Anim. Sci.** v.86, n.14, p.E19-35, 2008.
- GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; LI, H.Q.; WEI, W.; CONG, J.Y. The calpain system. **Physiological Reviews.** v.83, n.3, p.731-801, 2003.
- GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; TAYLOR, R.G.; ZALEWSKA, T. Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin. **Bioessays.** v.14, n.8, p.549-56, 1992.

- GONÇALVES, D.A.; LIRA, E.C.; BAVIERA, A.M.; CAO, P.; ZANON, N.M.; ARANY, Z.; BEDARD, N.; TANKSALE, P.; WING, S.S.; LECKER, S.H.; KETTELHUT, I.C.; NAVEGANTES, L.C. Mechanisms involved in cAMP-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. **Endocrinology**. v.150, p.5395-5404, 2009.
- GONÇALVES, D.A.; SILVEIRA, W.A.; LIRA, E.C.; GRAÇA, F.A.; PAULA-GOMES, S.; ZANON, N.M.; KETTELHUT, I.C.; NAVEGANTES, L.C. Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.302, n.1, p.E123-133, 2012.
- GONZALEZ, G.A.; MONTMINY, M.R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. **Cell**. v.59, n.4, p.675-80, 1989.
- GRAÇA, F.A.; GONÇALVES D.A.; SILVEIRA, W.A.; LIRA, E.C.; CHAVES, V.E.; ZANON, N.M.; GARÓFALO, M.A.; KETTELHUT, I.C.; NAVEGANTES, L.C. Epinephrine depletion exacerbates the fasting-induced protein breakdown in fast-twitch skeletal muscles. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v.305, n.12, p.E1483-E1494, 2013.
- GRUMATI, P.; COLETTI, L.; SCHIAVINATO, A.; CASTAGNARO, S.; BERTAGGIA, E.; SANDRI, M.; BONALDO, P. Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles. **Autophagy**. v.7, n.12, p.1415-1423, 2011.
- GRUTTER, M.G. Caspases: key players in programmed cell death. **Curr Opin Struct Biol**. v.10, n.6, p.649-655, 2000.
- HAAN, C.; BEHRMANN, I. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. **J. Immunol. Methods**. v.318, n.1-2, p.11-19, 2007.

- HAANEN, C.; VERMES, I. Apoptosis: Programmed cell death in fetal development. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** v.64, n.1, p.129-133, 1996.
- HE, S.; WANG, C.; DONG, H.; XIA, F.; ZHOU, H.; JIANG, X.; PEI, C.; REN, H.; LI, H.; LI, R.; XU, H. Immune-related GTPase M (IRGM1) regulates neuronal autophagy in a mouse model of stroke. **Autophagy.** v.8, p.1621–1627, 2012.
- HEDHLI, N.; DEPRE, C. Proteasome inhibitors and cardiac cell growth. **Cardiovasc Res.** v.85, p.321–329, 2010.
- HERSHKO, A. Lessons from the discovery of the ubiquitin system. **Trends Biochem Sci.** v.21, p.445-449, 1996.
- HINKLE, R.T.; DOLAN E., CODY D.B., BAUER M.B., ISFORT R.J. Phosphodiesterase 4 inhibition reduces skeletal muscle atrophy. **Muscle Nerve.** v.32, p.775-781, 2005.
- HOPKINS, P.M. Skeletal muscle physiology **Critical Care & Pain.** v.6, n.1, p.42–44, 2006.
- JACKMAN, R.W.; KANDARIAN, S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** v.287, p.834-843, 2004.
- JAGOE, R.T.; GOLDBERG, A.L. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** v.4, p.183-190, 2001.
- JEONG, Y. J.; CUI, X.S.; KIM, B.K.; KIM, I.H.; KIM, T.; CHUNG, Y.B.; KIM, N.H. Haploidy influences Bak and Bcl-xL mRNA expression and

- increases incidence of apoptosis in porcine embryos. **Zygote**. v.13, n.1, p.17-21, 2005.
- JOASSARD, O.R.; AMIROUCHE, A.; GALLOT, Y.S.; DESGEORGES, M.M.; CASTELLS, J.; DURIEUX, A.C.; BERTHON, P.; FREYSSENET, D.G. Regulation of Akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in response to formoterol administration in rat skeletal muscle. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v.45, n.11, p.2444-2455, 2013a.
 - JOASSARD, O.R.; DURIEUX, A.; FREYSSENET, D.G. β_2 -Adrenergic agonists and the treatment of skeletal muscle wasting disorders. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v.45, p.2309-2321, 2013b.
 - JONES, D.; ROUND, J.; HAAN, A. **Skeletal Muscle from Molecules to Movement: A textbook of Muscle Physiology for Sport, Exercise, Physiotherapy and Medicine**. London, UK: Churchill Livingstone, 2004.
 - JOSHI, R.; KADEER, N.; SHERIFF, S.; FRIEND, L.A.; JAMES, J.H.; BALASUBRAMANIAM, A. Phosphodiesterase (PDE) inhibitor torbafylline (HWA 448) attenuates burn-induced rat skeletal muscle proteolysis through the PDE4/cAMP/EPAC/PI3K/Akt pathway. **Mol. Cell. Endocrinol.** v.393, n.1-2, p.152-163, 2014.
 - JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
 - KABEYA, Y.; MIZUSHIM, N.; UENO, T.; YAMAMOTO, A.; KIRISAKO, T.; NODA, T.; KOMINAMI, E.; OHSUMI, Y.; YOSHIMORI, T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **EMBO J.** v.19, p.5720–5728, 2000.
 - KANDARIAN, S.C.; JACKMAN, R.W. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy **Muscle & nerve**. v.33, p.155-165, 2006.

- KARBOWSKI, M.; NORRIS, K.L.; CLELAND, M.M.; JEONG, S.Y.; YOULE, R.J. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. **Nature**. v.443, n.7112, p.658-662, 2006.
- KAWASAKI, H.; SPRINGETT, G.M.; MOCHIZUKI, N.; TOKI, S.; NAKAYA, M.; MATSUDA, M.; HOUSMAN, D.E.; GRAYBIEL, A.M. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. **Science**, v.282, p.2275–2279, 1998
- KEMP, C.M.; OLIVER, W.T.; WHEELER, T.L.; CHISHTI, A.H.; KOOHMARAIE, M. The effects of Capn1 gene inactivation on skeletal muscle growth, development, and atrophy, and the compensatory role of other proteolytic systems. **J Anim Sci**. v.91, n.7, p.3155-3167, 2013.
- KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. **Histologia e biologia celular. Uma introdução à patologia**. New York: Elsevier, 2004.
- KIM, S.J.; NIAN, C.; WIDENMAIER, S.; MCINTOSH, C.H. Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide-Mediated Up-Regulation of -Cell Antiapoptotic Bcl-2 Gene Expression Is Coordinated by Cyclic AMP (cAMP) Response Element Binding Protein (CREB) and cAMP-Responsive CREB Coactivator 2 **Mol Cell Biol**. v.28, n.5, p.1644-1656, 2008.
- KIM, Y.S.; SAINZ, R.D.; MOLENAAR, P.; SUMMERS, R.J. Characterization of beta1- and beta2-adrenoceptors in rat skeletal muscles. **Biochem. Pharmacol**. v.42, p.1783-1789, 1991.
- KLAUDE, M.; FREDRIKSSON, K.; TJÄDER, I.; HAMMARQVIST, F.; AHLMAN, B.; ROOYACKERS, O.; WERNERMAN, J. Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis. **Clin. Sci**. v.112, p.499-506, 2007.

- KLIONSKY, D. J.; ABDELMOHSEN, K.; ABE, A.; ABEDIN, M.J.; ABELIOVICH, H.; ACEVEDO-ARZENA, A.; ADACHI, H.; ADAMS, C.M.; ADAMS, P.D.; ADELI, K.; ADHIHETTY, P.J.; ADLER, S.G.; AGAM, G.; AGARWAL, R.; AGHI, M.K.; AGNELLO, M.; AGOSTINIS, P.; AGUILAR, P.V.; AGUIRRE-GHISO, J.; AIROLDI, E.M. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. 3rd ed. **Autophagy**. v.12, n.1, p.1-222, 2016.
- KOH, T.J.; TIDBALL, J.G. Nitric oxide inhibits calpain-mediated proteolysis of talin in skeletal muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol**. v.279, n.3, p.C806–C812, 2000.
- KOOPMAN, R.; RYALL, J.G.; CHURCH, J.E.; LYNCH, G.S. The role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: therapeutic implications for muscle wasting disorders. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**. v.12, n.6, p.601-606, 2009.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v.227, p.680-685, 1970.
- LEE, C.Q.; YUN, Y.D.; HOEFFLER, J.P.; HABENER, J.F. Cyclic-AMP-responsive transcriptional activation of CREB-327 involves interdependent phosphorylated subdomains. **EMBO J**. v.9, n.13, p.4455–4465, 1990.
- LEE, S.W.; DAI, G.; HU, Z.; WANG, X.; DU, J.; MITCH, W.E. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. **J. Am. Soc. Nephrol**. v.15, p.1537-1545, 2004.
- LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**. v.132, n.1, p.27-42, 2008.

- LI, F.; LIU, Y.; QIN, F.; LUO, Q.; YANG, H.; ZHANG, Q.; LIU, T.C. Photobiomodulation on Bax and Bcl-2 Proteins and SIRT1/PGC-1 α Axis mRNA Expression Levels of Aging Rat Skeletal Muscle. **Int. J. Photoenergy**. Article ID 384816, 8 pages, 2014.
- LI, Y.P.; ATKINS, C.M.; SWEATT, J.D.; REID, M.B. Mitochondria mediate tumor necrosis factor- α /NF- κ B signaling in skeletal muscle myotubes. **Antiox Redox Signal** v.1, p.97-104, 1999.
- LI, Y.P.; REID, M.B. NF- κ B mediates the protein loss induced by TNF- α in differentiated skeletal muscle myotubes. **Am J Physiol**. v.279, p.R1165-R1170, 2000.
- LI, Y.P.; SCHWARTZ, R.J.; WADDELL, I.D.; HOLLOWAY, B.R.; REID, M.B. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- κ B activation in response to tumor necrosis factor α . **FASEB J**. v.12, p.871-880, 1998.
- LIRA, E.C.; GONÇALVES, D.A.; PARREIRAS-E-SILVA, L.T.; ZANON, N.M.; KETTELHUT, I.C.; NAVAGANTES, L.C. Phosphodiesterase 4 inhibition reduces proteolysis and atrogene expression in rat skeletal muscles. **Muscle Nerve**. v.44, p.371-381, 2011.
- LIRA, E.C.; GRACA, F.A.; GONCALVES, D.A.; ZANON, N.M.; BAVIERA, A.M.; STRINDBERG, L.; LÖNNROTH, P.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C.; NAVAGANTES, L.C. Cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase inhibitors reduce skeletal muscle protein catabolism in septic rats. **Shock**. v.27, n.6, p.687-694, 2007.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**. v.193, n.1, p.265-275, 1951.

- LYNCH, G.S.; RYALL, J.G. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. **Physiol Rev.** v.88, n.2, p.729-767, 2008.
- MACDONALD, N.; EASSON, A.M.; MAZURAK, V.C.; DUNN, G.P.; BARACOS, E. Understanding and managing cancer cachexia. **J. Am. Coll. Surg.** v.197, p.143-161, 2003.
- MACHADO, J.; MANFREDI, L.H.; SILVEIRA, W.A.; GONÇALVES, D.A.P.; LUSTRINO, D.; ZANON, N.M.; KETTELHUT, I.C.; NAVEGANTES, L.C. Calcitonin gene-related peptide inhibits autophagic-lysosomal proteolysis through cAMP/PKA signaling in rat skeletal muscles. **Int J Biochem Cell Biol.** v.72, p.40-50, 2016.
- MARAT, A.L.; HAUCKE, V. Phosphatidylinositol 3-phosphates-at the interface between cell signalling and membrane traffic. **EMBO. J.** v.35, n.6, p.561-579, 2016.
- MARIEB, E.N.; HOEHN, K.N. **Human Anatomy & Physiology**, San Francisco: Benjamin Cummings, 2010.
- MARZBAN, H.; DEL BIGIO, M.R.; ALIZADEH, J.; GHAVAMI, S.; ZACHARIAH, R.M.; RASTEGAR, M. Cellular commitment in the developing cerebellum **Front Cell Neurosci.** v.12, p.450, 2015.
- MASIERO, E.; AGATEA, L.; MAMMUCARI, C.; BLAAUW, B.; LORO, E.; KOMATSU, M.; METZGER, D.; REGGIANI, C.; SCHIAFFINO, S.; SANDRI, M. Autophagy is required to maintain muscle mass. **Cell Metab.** v.10, p.507-15, 2009.
- MCCOMAS, A.J. **Skeletal muscle: form and function**. Champaign, Il.: Human Kinetics, 1996.

- MELLONI, E.; AVERNA, M.; STIFANESE, R.; DE TULLIO, R.; DEFRANCHI, E.; SALAMINO, F.; PONTREMOLI, S. Association of calpastatin with inactive calpain: a novel mechanism to control the activation of the protease? **J Biol Chem.** v.281, n.34, p.24945-24954, 2006.
- MILLIGAN, G.; KOSTENIS, E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. **Br J Pharmacol.** v.147, p.46-55, 2006.
- MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell.** v.147, n.4, p.728-741, 2011.
- MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v.27, p.107-132, 2011.
- MOLDAWER, L.L.; SATTLER, F.R. Human immunodeficiency virus-associated wasting and mechanisms associated with inflammation. **Semin Oncol.** v.25, p.73-81, 1998.
- MOLEJON, M.I.; ROPOLO, A.; RE, A.L.; BOGGIO, B.; VACCARO, M.I. The VMP1-Beclin 1 interaction regulates autophagy induction. **Sci. Rep.** v.3, p.1055, 2013.
- MOLLER, D.E. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Trends Endocrinol Metab.** v.11, n.6, p.212-217, 2000.
- MOREL, E.; MEHRPOUR, M.; BOTTI, J.; DUPONT, N.; HAMAÏ, A.; NASCIMBENI, A.C.; CODOGNO, P. Autophagy: A druggable Process. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v.57, p.375-398, 2017.

- MURTON, A.J.; CONSTANTIN, D.; GREENHAFF, P.L. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1782, 12, p.730-743, 2008.
- MYEKU, N.; FIGUEIREDO-PEREIRA, M.E. Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: association with sequestosome 1/p62. **J. Biol. Chem.** v.286, n.25, p.22426-22440, 2011.
- NAVEGANTES, L.C.; RESANO, N.M.; BAVIERA, A.M.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. CL 316,243, a selective beta3-adrenergic agonist, inhibits protein breakdown in rat skeletal muscle. **Pflugers Arch.** v.451, p.617-624, 2006.
- NAVEGANTES, L.C.; RESANO, N.M.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Catecholamines inhibit Ca²⁺-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through β_2 -adrenoceptors and cAMP. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.281, p.E449-E454, 2001.
- NAVEGANTES, L.C.; RESANO, N.M.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.279, p.E663-E668, 2000.
- NETI, G.; NOVAK, S.M.; THOMPSON, V.F.; GOLL, D.E. Properties of easily releasable myofilaments: are they the first step in myofibrillar protein turnover? **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** v.296, p.C1383-1390, 2009.
- NICHOLSON, C.D.; SHAHID, M. Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes--their potential utility in the therapy of asthma. **Pulm. Pharmacol.** v.7, p.1-17, 1994.

- NICHOLSON, C.D.; CHALLISS, R.A.J.; SHAHID, M. Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. **Trends Pharmacol. Sci.** v.12, p.19–27, 1991.
- OHNUKI, Y.; UMEKI, D.; MOTOTANI, Y.; JIN, H.; CAI, W.; SHIOZAWA, K.; SUITA, K.; SAEKI, Y.; FUJITA, T.; ISHIKAWA, Y.; OKUMURA, S. Role of cyclic AMP sensor Epac1 in masseter muscle hypertrophy and myosin heavy chain transition induced by β 2-adrenoceptor stimulation. **J Physiol.** v.15, p. 5461-5475, 2014.
- OHNUKI, Y.; UMEKI, D.; MOTOTANI, Y.; SHIOZAWA, K.; NARIYAMA, M.; ITO, A.; KAWAMURA, N.; YAGISAWA, Y.; JIN, H.; CAI, W.; SUITA, K.; SAEKI, Y.; FUJITA, T.; ISHIKAWA, Y.; OKUMURA, S. Role of phosphodiesterase 4 expression in the Epac1 signaling-dependent skeletal muscle hypertrophic action of clenbuterol. **Physiol. Rep.** v.4, p.e12791, 2016.
- OMORI, K.; KOTERA, J. Overview of PDEs and their regulation. **Circ. Res.** v.100, p.309-327, 2007.
- PARADISO, K.; BREHM, P. Long-term desensitization of nicotinic acetylcholine receptors is regulated via protein kinase A-mediated phosphorylation. **J. Neurosci.** v.18, p.9227-9237, 1998.
- PENG, S.; YAN, H.Z.; LIU, P.R.; SHI, X.W.; LIU, C.L.; LIU, Q.; ZHANG, Y. Phosphodiesterase 4 Inhibitor Roflumilast Protects Rat Hippocampal Neurons from Sevoflurane Induced Injury via Modulation of MEK/ERK Signaling **Cell Physiol Biochem.** v.45, n.6, p.2329-2337, 2018.
- PEPATO, M.T.; MIGLIORINI, R.H.; GOLDBERG, A.L.; KETTELHUT, I.C. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from

- streptozotocin-diabetic rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.271, p.E340-E347, 1996.
- PETTIPHER, E.R.; LABASI, J.M.; SALTER, E.D.; STAM, E.J.; CHENG, J.B.; GRIFFITHS, R.J. Regulation of tumour necrosis factor production by adrenal hormones in vivo: insights into the antiinflammatory activity of rolipram. **Br. J. Pharmacol.** v.117, p.1530–1534, 1996.
 - POWERS, S.K.; KAVAZIS, A.N.; DERUISSEAU K.C. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.288, n.2, p.R337–R344, 2005.
 - PRIMEAU, A.J.; ADHIHETTY, P.J.; HOOD, D.A. Apoptosis in heart and skeletal muscle. **Can. J. Appl. Physiol.**, v.27, p.349-395, 2002.
 - PROIKAS-CEZANNE, T.; TAKACS, Z.; DÖNNES, P.; KOHLBACHER, O. WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. **J. Cell Sci.** v.128, n.2, p.207-217, 2015.
 - PTACEK, J.; DeVGAN, G.; MICHAUD, G.; ZHU, H.; ZHU, X.; FASOLO, J.; GUO, H.; JANA, G.; BREITKREUTZ, A.; SOPKO, R.; MACCARTNEY, R.R.; SCHIMIDT, M.C.; RACHIDI, N.; LEE, S.J.; MAH, A.S.; MENG, L.; STARK, M.J.; STERN, D.F.; DE VIRGILIO, C.; TYERS, M.; ANDREWS, B.; GERSTEIN, M.; SCHWEITZER, B.; PREDKI, P.F.; SNYDER, M. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. **Nature.** v.438, n.7068, p.679-684, 2005.
 - PURINTRAPIBAN, J.; WANG, M.C.; FORSBERG, N.E. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** v.136, n.3, p.393–401, 2003.
 - RAHIMI, N. The Ubiquitin-Proteasome System Meets Angiogenesis. **Mol Cancer Ther.** v.11, n.3, p.538-548, 2012.

- RAVIKUMAR, B.; SARKAR, S.; DAVIES, J.E.; FUTTER, M.; GARCIA-ARENCIBIA, M.; GREEN-THOMPSON, Z.W.; JIMENEZ-SANCHEZ, M.; KOROLCHUK, V.I.; LICHTENBERG, M.; LUO, S.; MASSEY, D.C.; MENZIES, F.M.; MOREAU, K.; NARAYANAN, U.; RENNA, M.; SIDDIQI, F.H.; UNDERWOOD, B.R.; WINSLOW, A.R.; RUBINSZTEIN, D.C. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiol Rev.** v.90, n.4, p.1383-1435, 2010.
- ROM, O.; REZNICK, A.Z. The role of E3 ubiquitin-ligases MuRF-1 and MAFbx in loss of skeletal muscle mass. **Free Radic. Biol. Med.** v.98, p.218-230, 2016.
- ROSSI, D.; GAIDANO, G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. **Haematologica.** v.88, p.212-218, 2003.
- RYALL, J.G.; LYNCH, G.S. The potential and the pitfalls of beta-adrenoceptor agonists for the management of skeletal muscle wasting. **Pharmacol. Ther.** v.120, n.3, p.219-232, 2008.
- SAINI, A.; FAULKNER, S.; AL-SHANTI, N.; STEWART, C. Powerful signals for weak muscles. **Ageing research reviews,** v.8, p.251-267, 2009.
- SAKUMA, K.; AOI, W.; YAMAGUCHI, A. Molecular mechanism of sarcopenia and cachexia: recent research advances. **Pflugers Arch.** v. 469, n. 5-6, p.573-591, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1933-3>.
- SALA, D.; ZORZANO, A. Differential control of muscle mass in type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Cell. Mol. Life Sci.** v.72, n.20, p.3803-3817, 2015.
- SALAMINO, F.; AVERNA, M.; TEDESCO, I.; DE TULLIO, R.; MELLONI, E.; PONTREMOLI, S. Modulation of rat brain calpastatin efficiency by post-translational modifications. **FEBS Lett.** v.412, p.433-438, 1997.

- SALAMINO, F.; DETULLIO, R.; MENGOTTI, P.; MELLONI, E.; PONTREMOLI, S. Differential Regulation of μ -Calpain and m-Calpain in Rat Hearts Perfused with Ca^{2+} and cAMP. **Bioch. Bioph. Res. Comm.** v.202, n.3, p.1197–1203, 1994.
- SANDRI, M. New findings of lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** v.14, n.3, p.223-229, 2011.
- SANDRI, M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v.45, 10, p.2121-2129, 2013.
- SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology (Bethesda).** v.23, p.160-170, 2008.
- SANDRI, M.; SANDRI, C.; GILBERT, A.; SKURK, C.; CALABRIA, E.; PICARD, A.; WALSH, K.; SCHIAFFINO, S.; LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L. FoxO transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell.** v.117, p.399-412, 2004.
- SANTANGELO, G.M. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev.** v.70, n.1, p.253-282, 2006.
- SCHIAFFINO, S.; SANDRI, M.; MURGIA, M. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity **Physiology (Bethesda).** v.22, p.269-278, 2007.
- SCHMIDT, M.; DEKKER, F.J.; MAARSINGH, H. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. **Pharmacol. Rev.** v.65, n.2, p.670-709, 2013.

- SCHULTZ, L.B.; CHEHAB, N.H.; MALIKZAY, A.; HALAZONETIS, T.D. P53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. **J Cell Biol.** v.151, n.7, p.1381-1390, 2000.
- SEKUT, L.; YARNALL, D.; STIMPSON, S.A.; NOEL, L.S.; BATEMAN-FITE, R.; CLARK, R.L.; BRACKEEN, M.F.; MENIUS JR, J.A.; CONNOLLY, K.M. Anti-inflammatory activity of phosphodiesterase (PDE)-IV inhibitors in acute and chronic models of inflammation. **Clin. Exp. Immunol.** v.100, p.126–132, 1995.
- SERRANO, B.P.; HARDY, J.A. Phosphorylation by protein kinase A disassembles the caspase-9 core **Cell Death Differ.** v. 25, n.6, p. 1025-1039. 2018. DOI: 10.1038/s41418-017-0052-9.
- SHEFFIELD-MOORE, M.; URBAN, R.J. An overview of the endocrinology of skeletal muscle **Trends in endocrinology and metabolism.** v.15, p.110-115, 2004.
- SHEPHERD, M.; MCSORLEY, T.; OLSEN, A.E.; JOHNSTON, L.A.; THOMSON, N.C.; BAILLIE, G.S.; HOUSLAY, M.D.,; BOLGER, G.B. Molecular cloning and subcellular distribution of the novel PDE4B4 cAMP-specific phosphodiesterase isoform. **Biochem. J.** v.370, p.429-438, 2003.
- SILVEIRA, W.A.; GONÇALVES, D.A.; GRAÇA, F.A.; ANDRADE-LOPES, A.L.; BERGANTIN, L.B.; ZANON, N.M.; GODINHO, R.O.; KETTELHUT, I.C.; NAVEGANTES, L.C. Activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis: implications for sympathetic regulation. **J Appl Physiol (1985).** v.117, n.1, p.11-19, 2014.
- SISHI, B.J.; ENGELBRECHT, A.M. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces atrophy and apoptosis in L6 myotubes. **Cytokine.** v.54, n.2, p.173-184, 2011.

- SMITH, I.J.; DODD, S.L. Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signaling pathway in rat diaphragm muscle. **Exp Physio.** v.92, n.3, p.561-573, 2007.
- SOLOMON, V.; GOLDBERG, A.L. Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. **J. Biol. Chem.** v.271, p.26690-26697, 1996.
- SPANOS, S.; RICE, S.; KARAGIANNIS, P.; TAYLOR, D.; BECKER, D.L.; WINSTON, R.M.L.; HARDY, K. Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. **Reprod.** v.124, n.3, p.353-363, 2002.
- STITT, T.N.; DRUJAN, D.; CLARKE, B.A.; PANARO, F.; TIMOFEYVA, Y.; KLINE, W.O.; GONZALEZ, M.; YANCOPOULOS, G.D.; GLASS, D.J. The IGF-1/PI3K/AKT pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FoxO transcription factors. **Mol. Cell.** v.14, p.395-403, 2004.
- SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas **Physiol. Res.** v.50, p.536-546, 2001.
- TAILLANDIER, D.; AUROUSSEAU, E.; MEYNIAL-DENIS, D.; BECHET, D.; FERRARA, M.; COTTIN, P.; DUCASTAING, A.; BIGARD, X.; GUEZENNEC, C.; SCHMID, H.; ATTAIX, D. Coordinate activation of lysosomal, Ca²⁺ activated and ATP-ubiquitin dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. **Biochem. J.** v.316, p.65-72, 1996.
- TALBERT, E.E.; SMUDER, A.J.; MIN, K.; KWON, O.S.; POWERS, S.K. Calpain and caspase-3 play required roles in immobilization-induced limb muscle atrophy. **J. Appl. Physiol. (1985).** v.114, n.10, p.1482-1489, 2013.

- TEIXEIRA, M.M.; GRISTWOOD, R.W.; COOPER, N.; HELLEWELL, P.G. Phosphodiesterase (PDE)4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? **Trends Pharmacol Sci.** v.18, n.5, p.164-171, 1997.
- TISDALE, M.J. Wasting in cancer. **J Nutr.** v.129, p.243S-246S, 1999.
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.
- TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **Journal Clinical Pathology.** v.22, p.158-161, 1969.
- TSAI, L.K. Therapy development for spinal muscular atrophy in SMN independent targets. **Neural Plast.** Volume 2012, Article ID 456478, 13 p. 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/456478>.
- VON HAEHLING, S.; GENTH-ZOTZ, S.; ANKER, S.D.; VOLK, H.D. Cachexia: A therapeutic approach beyond cytokine antagonism. **Int. J. Cardiol.** v.85, p.173–183, 2002.
- WAALKES, T.P.; UDENFRIEND, S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. **J Lab Clin Med.** v.50, p.733-736, 1957.
- WANG, D.T.; LU, L.; SHI, Y.; GENG, Z.B.; YIN, Y.; WANG, M.; WEI, L.B. Supplementation of ketoacids contributes to the up-regulation of the Wnt7a/Akt/p70S6K pathway and the down-regulation of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems in the muscle of 5/6 nephrectomised rats. **Br. J. Nutr.** v.111, n.9, p.1536-1548, 2014.
- WANG, X.; LI, J.; ZHENG, H.; SU, H.; POWELL, S. Proteasome functional insufficiency in cardiac pathogenesis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.301, n.6, p.2207-2219, 2011.

- WILKINSON, K.D. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. **Semin Cell Dev Biol.** v.11, n.3, p.141-148, 2000.
- WILLIAMS, A.B.; DECOURTEN-MYERS, G.M.; FISCHER, J.E.; LUO, G.; SUN, X.; HASSELGREN, P.O. Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. **FASEB J.** v.13, p.1435-1443, 1999.
- YANG, H.; YANG, L. Targeting cAMP/PKA pathway for glycemic control and type 2 diabetes therapy. **Journal of Molecular Endocrinology.** v.57, p.R93–R108, 2016.
- YANG, S.Y.; HOY, M.; FULLER, B.; SALES, K.M.; SEIFALIAN, A.M.; WINSLET, M.C. Pretreatment with insulin-like growth factor I protects skeletal muscle cells against oxidative damage via PI3K/Akt and ERK1/2 MAPK pathways. **Lab. Invest.** v.90, n.3, p.391-401, 2010.
- ZHANG, X.; ODOM, D.T.; KOO, S.H.; CONKRIGHT, M.D.; CANETTIERI, G.; BEST, J.; CHEN, H.; JENNER, R.; HERBOLSHEIMER, E.; JACOBSEN, E.; KADAM, S.; ECKER, J.R.; EMERSON, B.; HOGENESCH, J.B.; UNTERMAN, T.; YOUNG, R.A.; MONTMINY, M. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.102, p.4459–4464, 2005.

8. ANEXO

8.1. ANEXO I - Carta de aprovação pelo CEUA

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 39/2012

Interessado: AMANDA MARTINS BAVIERA

Projeto: Sinalização dependente de AMP cíclico na musculatura esquelética: controle da proteólise muscular na atrofia induzida pelo diabetes.

Parecer nº 63/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa "Sinalização dependente de AMP cíclico na musculatura esquelética: controle da proteólise muscular na atrofia induzida pelo diabetes", apresentado pela Professora Doutora AMANDA MARTINS BAVIERA.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JULHO de 2013, em formulário para este fim.

Araraquara, 23 de novembro de 2012.



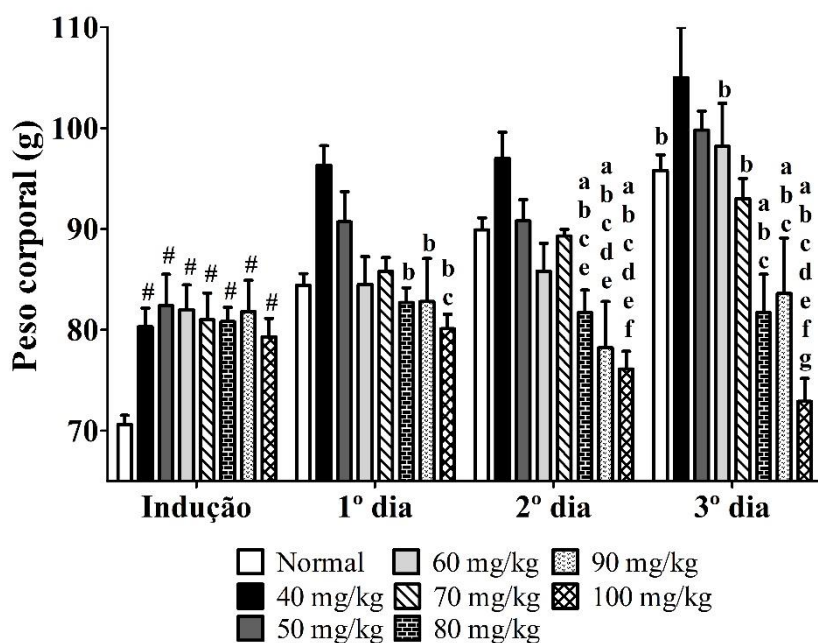
Prof.Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

8.2. ANEXO II – Padronização da dose de estreptozotocina (STZ)

Inesperadamente, a dose de STZ de 135 mg/kg previamente utilizada nos estudos de Pepato et al. (1996) e Baviera et al. (2007), promoveu 100% de mortalidade nos animais até o terceiro dia de acompanhamento, os animais que receberam STZ nas doses de 120 e 110 mg/kg também apresentaram 100% de mortalidade.

Na Figura 35 estão apresentados os valores médios relacionados à evolução de peso corporal de animais que receberam citrato (grupo normal) e animais que receberam STZ nas doses de 40 a 100 mg/kg. Estas doses não provoveram a mortadilade dos animais.

Figura 35: Valores médios de peso corporal de ratos normais e ratos que receberam estreptozotocina nas doses de 40 a 100 mg/kg, durante 3 dias.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. a, diferenças com normal; b, diferenças com 40mg/kg; c, diferenças com 50mg/kg; d, diferenças com 60mg/kg; e, diferenças com 70mg/kg; f, diferenças com 80mg/kg; g, diferenças com 90mg/kg; #, todos os grupos diferentes do normal no dia da indução do diabetes.

Animais normais, mesmo iniciando o experimento com menores valores de peso corporal, apresentaram um ganho de peso maior em relação aos animais que receberam STZ nas doses acima de 80 mg/kg.

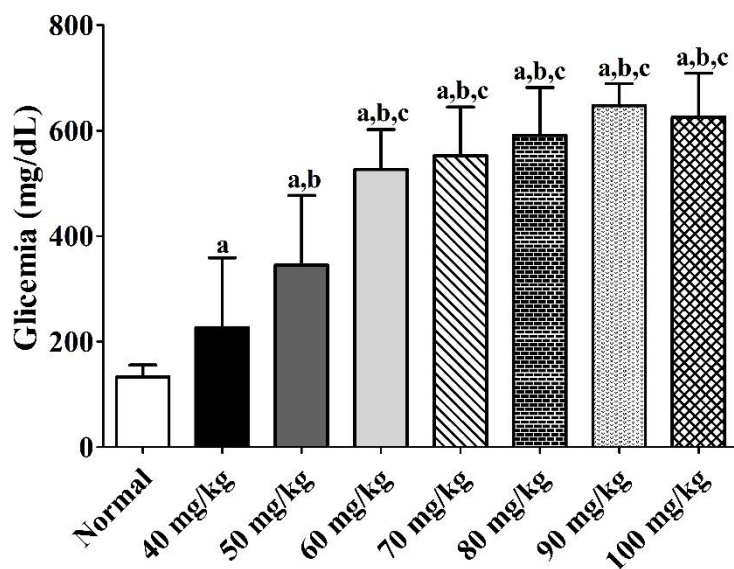
Animais que receberam STZ nas doses de 40 a 100 mg/kg não apresentaram o padrão de mortalidade observado com as doses de 110 a 135 mg/kg. Em relação a evolução de peso corporal, observa-se que animais que receberam 100 e 90 mg/kg de STZ apresentaram perda (100 mg/kg) ou manutenção (90 mg/kg) de peso corporal em relação ao dia da indução. Já animais que receberam 50 e 40 mg/kg de STZ apresentaram ganho de peso corporal semelhante aos animais normais, não configurando assim o perfil de menor ganho de peso corporal típico do modelo experimental desejado. Desta forma, as doses de STZ acima descritas não perfazem o perfil de ganho de peso corporal adequado relacionado ao modelo de diabetes mellitus necessário para este estudo.

Animais que receberam as doses de 60, 70 e 80 mg/kg de STZ apresentaram perfil de ganho de peso corporal semelhante àquele previamente observado nos trabalhos que utilizaram a dose de 135 mg/kg de STZ, em ratos jovens (Pepato et al., 1996, Baviera, 2007).

Os valores médios de glicemia dos animais 3 dias após a administração de citrato (grupo normal) ou STZ nas doses de 100 a 40 mg/kg encontram-se na Figura 36. Os animais que receberam as doses de 100, 90, 50 e 40 mg/kg de STZ apresentaram valores de glicemia condizentes com o perfil observado no peso corporal: as maiores doses de STZ fizeram com que os animais apresentassem valores de glicemia de aproximadamente 650 mg/dL, o que explica a severidade do diabetes experimental e a perda de peso 3 dias pós-STZ; já as menores doses de STZ estabeleceram glicemias com valores médios de 315 mg/dL (50 mg/kg) e 195 mg/dL (40 mg/kg), com maior ganho de peso corporal.

A dose de 60 mg/kg de STZ foi aquela que estabeleceu os valores médios de glicemia mais próximos daqueles alcançados anteriormente com a dose de 135 mg/kg de STZ (Pepato et al., 1996, Baviera, 2007), isto é, aproximadamente 500 mg/kg.

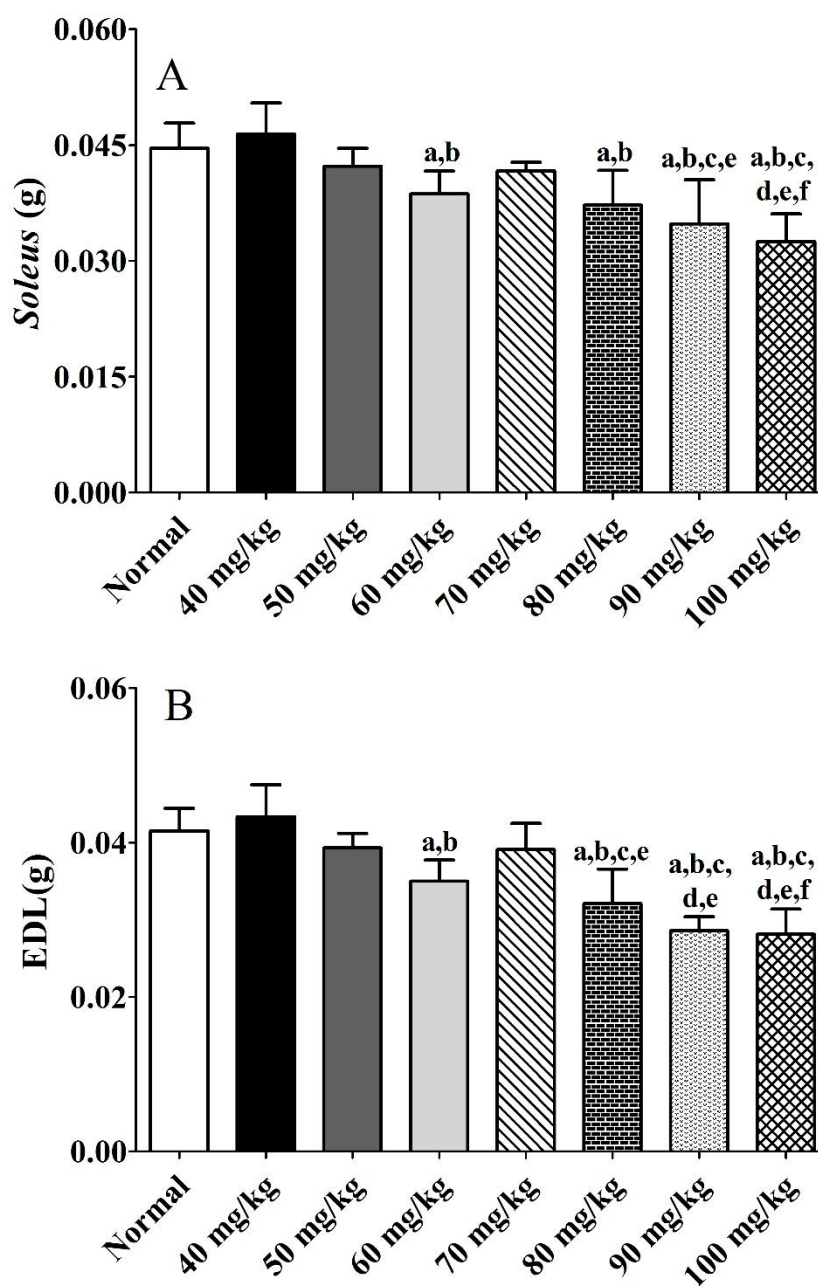
Figura 36: Valores médios de glicemia (mg/dL) de ratos normais e ratos que receberam estreptozotocina nas doses de 40 a 100 mg/kg



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. a, diferenças com normal; b, diferenças com 40mg/kg; c, diferenças com 50mg/kg.

Na Figura 37 encontram-se os valores médios de peso dos músculos *soleus* (A) e EDL (B) de animais normais e animais que receberam STZ nas doses de 40 a 100 mg/kg. Animais que receberam 100 e 90 mg/kg de STZ apresentaram os menores valores de pesos de músculos *soleus* e EDL, em comparação aos valores de animais normais; animais que receberam 50 e 40 mg/kg de STZ apresentaram pesos de *soleus* e EDL semelhantes aos valores de animais normais. Animais que receberam 60 mg/kg de STZ apresentaram perfil de peso de músculos *soleus* e EDL semelhantes aos anteriormente observados em animais que receberam a dose de 135 mg/kg de STZ nos estudos de Pepato et al. (1996) e Baviera et al. (2007): 3 dias após a administração de STZ, os pesos dos músculos *soleus* e EDL de ratos diabéticos foram 13 e 15% menores, respectivamente, em relação aos valores encontrados em animais normais.

Figura 37: Valores médios de peso de músculos *soleus* (A) e EDL (B) (g) de ratos normais e ratos que receberam estreptozotocina nas doses de 40 a 100 mg/kg.



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. a, diferenças com normal; b, diferenças com 40mg/kg; c, diferenças com 50mg/kg; d, diferenças com 60mg/kg; e, diferenças com 70mg/kg; f, diferenças com 80mg/kg.

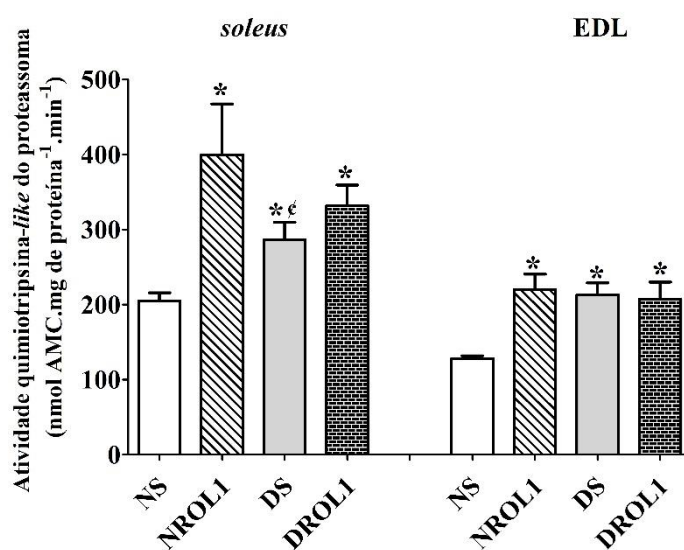
Assim, tendo como referência a reprodução de ganho de peso corporal, glicemia e pesos de músculos esqueléticos dos estudos anteriormente realizados por Pepato et al. (1996) e Baviera et al. (2007), a dose de 60 mg/kg foi selecionada para a continuidade das investigações.

8.3. ANEXO III - Padronização da dose de rolipram (ROL)

Após 3 dias da administração de STZ, a atividade quimi tripsina-like do proteassoma encontrou-se significativamente aumentada em *soleus* (40%) e EDL (66%) de ratos diabéticos em relação aos valores em animais normais (Figuras 38 a 40), corroborando o menor ganho de peso os músculos observado nestes animais.

O tratamento de animais diabéticos com 1 mg/kg de ROL não foi capaz de promover alterações na atividade do proteassoma, em ambos os músculos, em relação às alterações promovidas pelo diabetes. Inesperadamente, o tratamento de animais normais com 1 mg/kg de ROL promoveu um aumento significativo na atividade do proteassoma tanto em *soleus* (94%) quanto em EDL (71%), em comparação ao grupo NS (Figura 5).

Figura 38: Atividade quimi tripsina-like do proteassoma (nmol AMC/mg proteína/min) em músculos *soleus* e EDL de ratos normais e diabéticos tratados durante 3 dias com salina ou 1 mg/kg de rolipram (ROL).

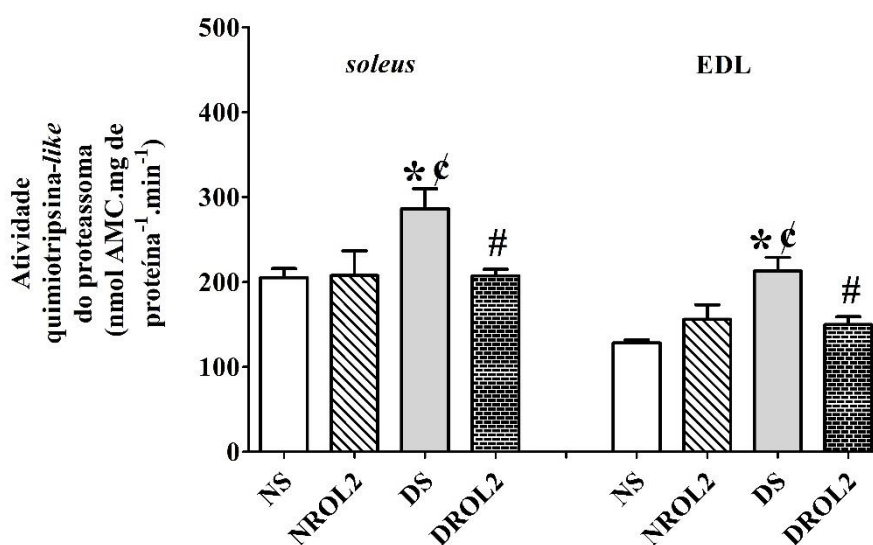


As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ¢, diferença com NROL; #, diferença com DS.

O tratamento de animais diabéticos com 2 mg/kg de ROL foi efetivo em promover redução na atividade do proteassoma, tanto em músculos *soleus* (27%) quanto em EDL (29%), em relação aos valores encontrados em DS. O tratamento de animais

normais com 2 mg/kg de ROL não promoveu alterações na atividade do proteassoma em *soleus* e EDL de animais normais ou diabéticos, apresentando valores semelhantes entre si (Figura 39).

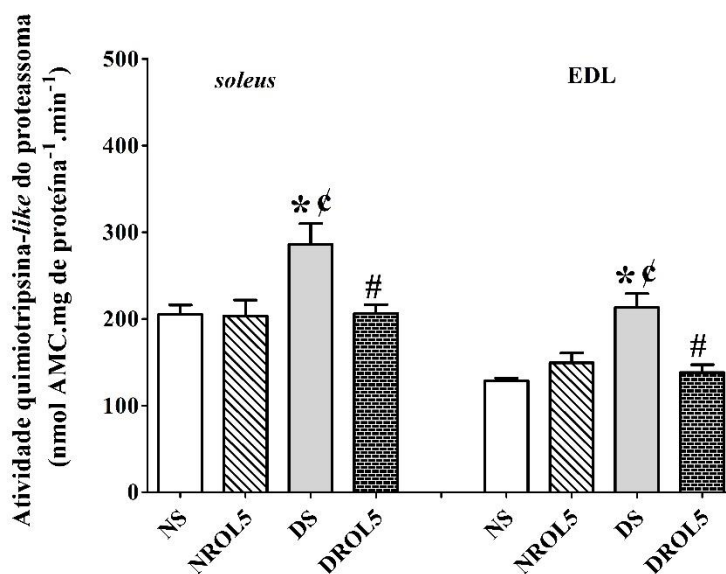
Figura 39: Atividade quimi tripsina-like do proteassoma (nmol AMC/mg proteína/min) em músculos *soleus* e EDL de ratos normais e diabéticos tratados durante 3 dias com salina ou 2 mg/kg de rolipram (ROL).



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ϕ , diferença com NROL; #, diferença com DS.

Tal como observado com a dose de 2 mg/kg de ROL, o tratamento de animais diabéticos com 5 mg/kg de ROL foi capaz de promover redução na atividade do proteassoma, tanto em músculos *soleus* (28%) quanto em EDL (35%), em relação aos animais diabéticos tratados com salina, em magnitude semelhante à dose de 2 mg/kg de ROL. A animais normais tratados com 5 mg/kg de ROL, em comparação ao grupo NS, não apresentaram alterações na atividade da protease em músculos *soleus* e EDL (Figura 40).

Figura 40: Atividade quimi tripsina-*like* do proteassoma (nmol AMC/mg proteína/min) em músculos soleus e EDL de ratos normais e diabéticos tratados durante 3 dias com salina ou 5 mg/kg de rolipram (ROL).



As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *, diferença com NS; ϕ, diferença com NROL; #, diferença com DS.

Considerando que as doses de 2 e 5 mg/kg de ROL apresentaram a mesma efetividade em promover inibição na atividade quimi tripsina-*like* do proteassoma em músculos *soleus* e EDL de ratos diabéticos, a dose de 2 mg/kg de ROL foi escolhida para a continuação dos estudos.

8.4. Artigo publicado: Involvement of cAMP/EPAC/Akt signaling in the antiproteolytic effects of pentoxifylline on skeletal muscles of diabetic rats.

RESEARCH ARTICLE

Involvement of cAMP/EPAC/Akt signaling in the antiproteolytic effects of pentoxifylline on skeletal muscles of diabetic rats

Carlos Alberto Arcaro,¹ Renata Pires Assis,¹ Neusa Maria Zanon,² Silvia Paula-Gomes,³ Luiz Carlos Carvalho Navegantes,² Isis Carmo Kettelhut,^{2,3} Iguatemy Lourenço Brunetti,¹ and Amanda Martins Baviera¹

¹Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Department of Physiology, University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; and ³Department of Biochemistry/Immunology, University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Submitted 28 May 2017; accepted in final form 10 December 2017

Arcaro CA, Assis RP, Zanon NM, Paula-Gomes S, Navegantes LC, Kettelhut IC, Brunetti IL, Baviera AM. Involvement of cAMP/EPAC/Akt signaling in the antiproteolytic effects of pentoxifylline on skeletal muscles of diabetic rats. *J Appl Physiol* 124: 704–716, 2018. First published December 14, 2017; doi:10.1152/jappphysiol.00499.2017.—Advances in the knowledge of the mechanisms controlling protein breakdown in skeletal muscles have allowed the exploration of new options for treating muscle-wasting conditions. Pentoxifylline (PTX), a nonselective phosphodiesterase (PDE) inhibitor, attenuates the loss of muscle mass during catabolic conditions, mainly via inhibiting protein breakdown. The aim of this study was to explore the mechanisms by which PTX inhibits proteolysis in the soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles of streptozotocin-induced diabetic rats. The levels of atrogin-1 and muscle RING finger-1 were decreased, as were the activities of caspase-3 (EDL) and calpains (soleus and EDL), in diabetic rats treated with PTX, which at least partly explains the drop in the ubiquitin conjugate (EDL) levels and in proteasome activity (soleus and EDL). Treatment with PTX decreased PDE activity and increased cAMP content in muscles of diabetic rats; moreover, it also increased both the protein levels of exchange protein directly activated by cAMP (EPAC, a cAMP effector) and the phosphorylation of Akt. The loss of muscle mass was practically prevented in diabetic rats treated with PTX. These findings advance our understanding of the mechanisms underlying the antiproteolytic effects of PTX and suggest the use of PDE inhibitors as a strategy to activate cAMP signaling, which is emerging as a promising target for treating muscle mass loss during atrophic conditions.

NEW & NOTEWORTHY cAMP signaling has been explored as a strategy to attenuate skeletal muscle atrophies. Therefore, in addition to β_2 AR agonists, phosphodiesterase inhibitors such as pentoxifylline (PTX) can be an interesting option. This study advances the understanding of the mechanisms related to the antiproteolytic effects of PTX on skeletal muscles of diabetic rats, which involve the activation of both exchange protein directly activated by cAMP and Akt effectors, inhibiting the expression of atrogenes and calpain/caspase-3-proteolytic machinery.

Akt; cAMP/EPAC signaling; pentoxifylline; skeletal muscle proteolysis; streptozotocin-diabetic rats

INTRODUCTION

Skeletal muscle function is mainly related to producing force and work required for whole body maintenance, locomotion, respiration, heat production, and overall metabolism. As the skeletal muscle has the largest pool of proteins in the whole body, protein metabolism is tightly regulated in this tissue by numerous nutritional, hormonal, and neural factors to maintain the precise balance between protein synthesis and degradation (50). These two processes are closely interrelated. During protein synthesis, proteins that are not correctly folded are promptly degraded; protein half-life is determined by the activity of the proteolytic machinery, and the proteolytic systems are also required to replace sarcomeric proteins in healthy skeletal muscles because of stressful changes related to mechanical, heat, and oxidative stress (53). However, although proteolysis is fundamental for skeletal muscle function and development (6), excessive protein breakdown is a major determinant of muscle mass loss.

It has been reported that accelerated protein degradation leading to a rapid loss of skeletal muscle mass may occur in a variety of conditions: 1) chronic diseases, such as cancer, diabetes mellitus, chronic heart failure, chronic kidney disease, chronic obstructive pulmonary disease, acquired immune deficiency syndrome, Cushing's syndrome, and skeletal muscle dystrophies, among others, leading to cachexia; 2) disuse conditions, such as denervation and immobilization, leading to muscle atrophy; and 3) sarcopenia due to aging (16, 21). A wide range of disturbances is observed in patients with progressive loss of skeletal muscle mass due to muscle wasting, such as decreased muscle strength, causing decreases in functional activity and exercise capacity, higher risk of bone loss and fractures, altogether reducing quality of life and increasing morbidity and mortality (16).

The recent advances in the knowledge of the mechanisms controlling protein metabolism in skeletal muscles have led to an understanding of the pathophysiological basis, leading to muscle mass loss during atrophic conditions. Additionally, recent studies have provided a basis for exploring new therapeutic possibilities for treating muscle wasting (16, 21).

Activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt signaling can induce skeletal muscle hypertrophy (25). Akt, also

Address for reprint requests and other correspondence: A. M. Baviera, São Paulo State Univ., School of Pharmaceutical Sciences, Dept. of Clinical Analysis, Rod Araraquara-Jau km 01 s/n, 14800-903, Araraquara, São Paulo, Brazil (e-mail: baviera@fctfar.unesp.br).

called protein kinase B (PKB), is a serine-threonine kinase that plays a central role in controlling protein metabolism; Akt elicits a hypertrophic profile, integrating the stimulation of protein synthesis via activation of mammalian target of rapamycin (9) and the inhibition of protein degradation by repressing the transcription of atrogenes via inhibiting Forkhead class O (FoxO) transcription factors (52, 57). There is accumulating evidence that PI3K/Akt signaling is impaired in skeletal muscles under various pathological conditions, leading to muscle atrophy (2, 3). Impairments in Akt activation under conditions of sarcopenia remain controversial. Although it has been suggested that this kinase does not appear to contribute to the loss of muscle mass in elderly subjects (51), others have shown that Akt is inhibited in muscles in sarcopenia (29, 63). Finally, it has been shown that Akt activation in muscles of animals with Duchenne's muscular dystrophy (DMD) causes hypertrophy and myofiber regeneration, improving muscle function, thereby suggesting that Akt can attenuate disease progression in DMD (46). Owing to these reasons, Akt appears to be a valuable target for improving muscle mass gain in various atrophic conditions.

Pentoxifylline (PTX) is a methylxanthine derivative that acts as a nonselective phosphodiesterase (PDE) inhibitor; it has been used to treat intermittent claudication for chronic occlusive arterial disease as it improves blood flow due to its hemorheologic properties, reducing both the blood viscosity and erythrocytes aggregation and rigidity. It is interesting to note that the pharmacological properties of PTX have been frequently revisited, and recent evidence indicates other possible beneficial effects for this old drug. In fact, drug repositioning promotes the identification of new uses for existing drugs, which offers opportunities for faster development times and reduced risk (1). Using several approaches, studies have suggested the repositioning of PTX for treating brain ischemia (36), diabetic nephropathy (8), and nonalcoholic fatty liver diseases (65). Furthermore, there is evidence that PTX can attenuate the loss of skeletal muscle mass during catabolic conditions, mainly via inhibiting the ubiquitin-proteasome system (UPS); the antiproteolytic effect of PTX has been attributed to its potential for inhibiting the production of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor α (TNF- α) (11, 56). However, the mechanisms by which PTX exerts its beneficial effects on preserving skeletal muscle mass deserve better investigation, especially the mechanisms involving Akt activation.

In this study to investigate whether PTX can activate Akt to exert its antiproteolytic effects, we used an experimental model of skeletal muscle atrophy in association with a strong reduction in Akt activity, streptozotocin-induced diabetic rats. This model mimics the symptoms and disturbances related to Type 1 diabetes mellitus, including the skeletal muscle wasting due to accelerated proteolysis (5). We chose two skeletal muscles with differential prevalence of fibers: the soleus (typical slow-twitch muscle, prevailing type 1, oxidative fibers) and the extensor digitorum longus (EDL, typical fast-twitch muscle, prevailing type 2B, glycolytic fibers). The ability of PTX to inhibit other proteolytic processes instead of UPS, such as caspase-3- and calpain-dependent proteolysis, was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Treatment

Male Wistar rats weighing 70–90 g (4 wk) were maintained under controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 5\%$) conditions with a 12:12-h light-dark cycle. Rats received water and laboratory chow diet (Presence, Brazil) ad libitum throughout the experiment. The experimental procedures were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation from the School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, Brazil (CEUA/FCF/CA resolution number 39/2012).

Induction of Experimental Diabetes Mellitus

After an acclimation period, experimental Type 1 diabetes mellitus was induced by a single intravenous injection of 60 mg/kg streptozotocin (STZ; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) dissolved in 0.01 M citrate buffer (pH 4.5) in 12-h fasted rats. Normal rats received only citrate buffer. For this procedure, all animals were anesthetized with isoflurane. Rats with postprandial glycemia values of ~ 480 mg/dl were allocated to the diabetic groups (5). Glycemia levels were determined via the glucose oxidase method (60) using a commercial kit (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil).

Experimental Design and Treatment

One day after citrate or STZ administration, normal and diabetic rats were sorted into four groups (eight rats/group) as follows: normal (NS) and diabetic (DS) rats treated with vehicle (saline; 0.9% NaCl), and normal (NPTX) and diabetic (DPTX) rats treated with 25 mg/kg PTX dissolved in saline. Animals were injected intraperitoneally with saline or PTX daily for 3 days.

Three days after the treatments, rats were euthanized by decapitation, and blood samples were used for determining glucose and TNF- α plasma levels. In addition, the soleus and EDL muscles were carefully excised and weighed. Skeletal muscles from the right legs were immediately used for determining the proteolytic activities; muscles from the left legs were frozen (-80°C) for the subsequent analysis of PDE activity and cAMP levels, and Western blot analysis was performed to determine protein levels of proteolytic machinery components and the protein/phosphorylation levels of intracellular signaling effectors.

Determination of Plasma Levels of TNF- α

The plasma levels of the proinflammatory cytokine TNF- α were measured by enzyme immunoassay (ELISA) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), using a standard curve range of 15.6–1,000 pg/ml. The results are expressed as picograms per milliliter.

Determination of PDE Activity in Skeletal Muscles

Skeletal muscles were homogenized in ice-cold buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) containing 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, and protease inhibitors [1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.5 μM aprotinin, and 100 μM leupeptin]. The homogenates were centrifuged at 10,000 g at 4°C for 15 min; supernatants were desalted and used for protein determination (37). Samples containing 15 μg of protein were used to estimate PDE activity (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY). According to the manufacturer's instructions, 5'-AMP released from the cleavage of 3',5'-cAMP by PDE is further cleaved by 5'-nucleotidase into the nucleoside and phosphate moieties; the phosphate group is then detected by using a reagent containing Malachite Green. The PDE activity was expressed in mU/mg protein (1 U PDE = 1 nmol 3',5'-cAMP cleaved into 5'-AMP per minute).

Determination of cAMP Levels in Skeletal Muscles

The levels of cAMP were measured in skeletal muscles using a method based on a competitive enzyme immunoassay system (GE Healthcare, Waukesha, WI). Skeletal muscles were homogenized in 6% trichloroacetic acid. After extracting lipids with diethyl ether, the aqueous phase was lyophilized and resuspended in the assay buffer. The cAMP levels were determined using a standard curve range of 25–3,200 fmol/well. The results are expressed as femtomoles per milligram of muscle.

Measurement of the Proteasome Activity

Chymotrypsin-like proteasome activity was assayed according to methods described by Klaude et al. (34). The soleus and EDL muscles were homogenized in Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing (in mM) 50 Tris-HCl, 1 EDTA, 100 KCl, 5 MgCl₂, and 1.8 ATP, and then centrifuged at 700 g at 4°C for 10 min to remove cell debris. Supernatants were centrifuged at 15,000 g for 10 min, and then glycerol was added to the supernatants (10% vol/vol), which were used for measuring protease activity. The chymotrypsin-like proteasome activity was measured with the substrate succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The supernatants were incubated with the assay buffer (pH 7.5) containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂, and 1 mM dithiothreitol (DTT); the substrate was then added (100 μM), and the reaction mixture was incubated at 37°C; the fluorescence of 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) was measured every 10 min for 180 min. Reactions were performed with supernatants incubated in the absence and presence of the proteasome inhibitor MG 132 (50 μM; Sigma Aldrich). The proteasome activity was determined by the difference between the fluorescence of AMC released upon incubating supernatants with the substrate in the absence and presence of MG 132. Data are expressed in micromoles AMC per milligram protein per minute.

Measurement of the Caspase-3 Activity

Caspase-3 activity was determined according to methods described by Du et al. (20), with modifications. The soleus and EDL muscles were homogenized in HEPES buffer (100 mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% Triton X-100, and 10 mM DTT; pH 7.5) and centrifuged at 15,000 g at 4°C for 45 min. The supernatants were added to the assay buffer (20 mM HEPES, 5 mM DTT, 10% sucrose, and 2 mM EDTA; pH 7.5). The substrate for caspase-3, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (Sigma Aldrich), was then added (50 μM), and the reaction mixture was incubated at 37°C; fluorescence of AMC was measured every 10 min for 180 min. Reactions were performed with supernatants incubated with the substrate in the absence and presence of the caspase-3 inhibitor, *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al (50 μM; Sigma Aldrich). Caspase-3 activity was determined by the difference between the amounts of AMC generated by the supernatants incubated with the substrate in the absence vs. in the presence of the caspase-3 inhibitor. Data are expressed in micromoles of AMC per milligram protein per minute.

Measurement of Calpain Activity

Calpain activity was determined as described by Douillard et al. (19). The soleus and EDL muscles were homogenized in Tris-HCl buffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, and 0.1% Triton X-100; pH 7.4) and centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4°C. Supernatants were added to the assay buffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, and 1 mM DTT; pH 7.4). The substrate for calpain (m-calpains and μ-calpains) *N*-Suc-Leu-Tyr-AMC (Sigma Aldrich) was then added (50 μM), and the reaction mixture was incubated at 37°C; the fluorescence of AMC was measured every 10 min for 180 min. Reactions were performed with supernatants incubated in the absence and presence of calpeptin (50 μM; Sigma Aldrich), a calpain inhibitor. The activity of calpain was determined by the difference between

the amounts of AMC generated by the supernatants incubated with the substrate in the absence vs. in the presence of calpeptin. Data are expressed in micromoles of AMC per milligram protein per minute.

For all proteolytic activity analyses, AMC fluorescence was measured using a fluorometer (FLx800 Fluorescence Reader; Biotek, Winooski, VT). A standard curve was prepared for AMC (Sigma Aldrich), and the fluorescence was measured with excitation and emission wavelengths of 380 and 460 nm, respectively. Data are expressed as micromoles of AMC per milligram protein per minute. Protein levels were determined according to methods described by Lowry et al. (37).

Western Blot Analysis

The soleus and EDL muscles were homogenized (Polytron Omni TH01, Kennesaw, GA) in ice-cold buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium orthovanadate, 0.8 μM aprotinin, 1 mM PMSF, and 2.3 mM leupeptin. The homogenates were centrifuged at 10,500 g at 4°C for 40 min, and the supernatants were used for protein determination (37). Sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, 100 mM DTT, and 0.02% bromophenol blue; pH 6.8) was added to the supernatants (1:1); samples containing 100 μg of protein were subjected to SDS-PAGE electrophoresis on 8% to 14% acrylamide gels (35) and then electroblotted onto nitrocellulose membranes (59). Proteins were detected by overnight incubation at 4°C with specific primary antibodies: antiubiquitin (1:750), antiatrogen-1 (1:1,000), antimuscle RING finger-1 (MuRF-1) (1:1,000), anticalpastatin (1:1,000), anticaspase-3 (1:1,000), anti-EPAC1 (1:1,000), anti-Akt (1:500), anti-phospho-(Ser-473)-Akt (1:500), and anti-phospho-(Thr-308)-Akt (1:500) (Cell Signaling, Danvers, MA). Anti-α-tubulin (1:1,000) was used as an internal control. Primary antibody binding was detected by peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:1,000; Cell Signaling) and visualized with enhanced chemiluminescent substrate prepared as follows: 0.1 mM Tris-HCl (pH 8.8), 5 mM luminol sodium salt, 4 mM 4-iodophenylboronic acid (diluted in DMSO), and 0.03% hydrogen peroxide (28, modified). Chemiluminescent bands were captured with a C-Digit Blot Scanner (LI-COR, Lincoln, NE), and the band intensities were analyzed using LI-COR Image Studio 4.0.

Statistical Analysis

Data are expressed as means ± SE. Statistical analyses were performed using the program GraphPad Instat 3.05 (GraphPad Software, San Diego, CA). One-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test was used to compare the intergroup differences. Differences were considered significant at *P* < 0.05.

RESULTS

Effects of the PTX Treatment on Glycemia, TNF-α Plasma Levels, Body Weight, and Skeletal Muscle Weights

We first examined the effects of PTX on glycemia, TNF-α plasma levels, and body weight gain (Table 1), and weights of skeletal muscles (Fig. 1). Although diabetic animals on the day of STZ administration (*day 0*) had body weight values higher than those of normal rats, the terminal body weights (*day 3*) were very similar among the groups (Table 1). This can be explained by the minor body weight gain observed in both diabetic saline (DS) and diabetic pentoxifylline (DPTX) rats in comparison with normal saline (NS) and normal pentoxifylline (NPTX) rats (Table 1), which is typical of the catabolic state caused by the insulin deficiency due to STZ administration.

Table 1. Differences in body weight and blood levels of glucose and TNF-α in normal and STZ-induced diabetic rats after 3 days of PTX treatment

| | Glycemia, mg/dl | Plasma TNF-α, pg/ml | Body Weight, g | | Body Weight Gain, g |
|------|-----------------|---------------------|----------------|-------------|---------------------|
| | | | Day 0 | Day 3 | Day 3 |
| NS | 112.1 ± 7.23 | 33.9 ± 4.24 | 72.9 ± 1.28 | 96.8 ± 1.59 | 24.1 ± 0.52 |
| NPTX | 117.7 ± 10.14 | 34.2 ± 4.66 | 73.1 ± 1.61 | 96.2 ± 1.94 | 23.0 ± 0.59 |
| DS | 482.3 ± 14.37*† | 57.8 ± 7.68*† | 80.9 ± 0.74*† | 94.1 ± 0.84 | 13.5 ± 0.47*† |
| DPTX | 485.4 ± 17.55*† | 25.2 ± 2.94# | 81.6 ± 0.84*† | 96.6 ± 1.03 | 14.4 ± 0.57*† |

Values are expressed as means ± SE; n = 8/group. Differences between groups were considered statistically significant if P < 0.05 and were analyzed with one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. NS, normal saline; NPTX, normal pentoxifylline; DS, diabetic saline; DPTX, diabetic pentoxifylline. *Significant differences with NS. †Significant differences with NPTX. #Significant differences with DS.

At the end of the experiment, DS and DPTX rats exhibited postprandial glycemia levels of ~480 mg/dl (3 days after STZ and 3 days of treatments with saline or PTX), which were significantly higher than the median values found in NS and NPTX rats (~115 mg/dl) (Table 1). As noted, the treatment with PTX did not cause any changes in body weight gain or the glycemia levels of both NPTX and DPTX groups when compared with the respective controls (Table 1).

Plasma levels of TNF-α were significantly increased (70%) in DS rats when compared with values in NS rats. Treating diabetic rats with PTX decreased the plasma levels (56%) of TNF-α when compared with values of DS. No changes were observed in the circulating levels of this proinflammatory cytokine in NPTX rats. These data are in agreement with previous results from our group (5).

The changes in the weights of the soleus (typical slow-twitch muscle) and EDL (typical fast-twitch muscle) were also examined in normal and diabetic rats after 3 days of the PTX treatment. As expected, the skeletal muscle atrophy due to insulin deficiency was observed, since the weights of both the soleus (Fig. 1A) and the EDL muscles (Fig. 1B) of DS rats were lower than the weights of NS rats. There were no changes in the weights of skeletal muscles of normal rats treated with PTX (NPTX group). The treatment of diabetic rats with PTX practically prevented the loss of muscle mass observed in diabetic rats, since the median values of muscles weights in DPTX rats were very similar to those of NS and NPTX rats, demonstrating that this PDE inhibitor exerted beneficial effects on preserving the skeletal muscle mass in a wasting condition, such as diabetes mellitus. In comparison with the previous study by our

group (5), this study demonstrates novel findings about the beneficial effects of PTX, highlighting 1) the use of a low PTX dose (25 mg/kg in this study vs. 100 mg/kg in the earlier study) and 2) the study of the PTX effects on slow-twitch (soleus) muscles, which had not been previously investigated.

Effects of PTX Treatment on Proteolytic Pathways in Skeletal Muscles

Ubiquitin-proteasome system. The onset of the atrophic profile in skeletal muscles of diabetic rats can be a consequence, at least in part, of the changes in the UPS. The protein levels of atrogin-1 (Fig. 2A) and MuRF-1 (Fig. 2B) were strongly increased in both the soleus (3.7-fold and 2.9-fold, respectively) and the EDL (2.8-fold and 3.3-fold, respectively) of DS rats. The levels of the ubiquitin conjugates were also significantly increased in the soleus (27%) and EDL (90%) of DS rats when compared with those in NS (Fig. 2C). The chymotrypsin-like activity of the proteasome was 46% and 78% higher, respectively, in both the soleus and the EDL muscles DS rats than in controls (Fig. 2D).

Treating diabetic rats with PTX practically prevented the increase in the levels of atrogenes. There were significant decreases in the protein levels of atrogin-1 (Fig. 2A) and MuRF-1 (Fig. 2B) in the soleus (3.1-fold and 2.7-fold, respectively) of DPTX rats in comparison with those of DS, as well as in EDL, with reductions of 2.7-fold and 2.8-fold, respectively, in atrogin-1 (Fig. 2A) and MuRF-1 (Fig. 2B) levels.

PTX treatment differentially affected ubiquitin conjugates in the soleus and EDL muscles. Although the increase

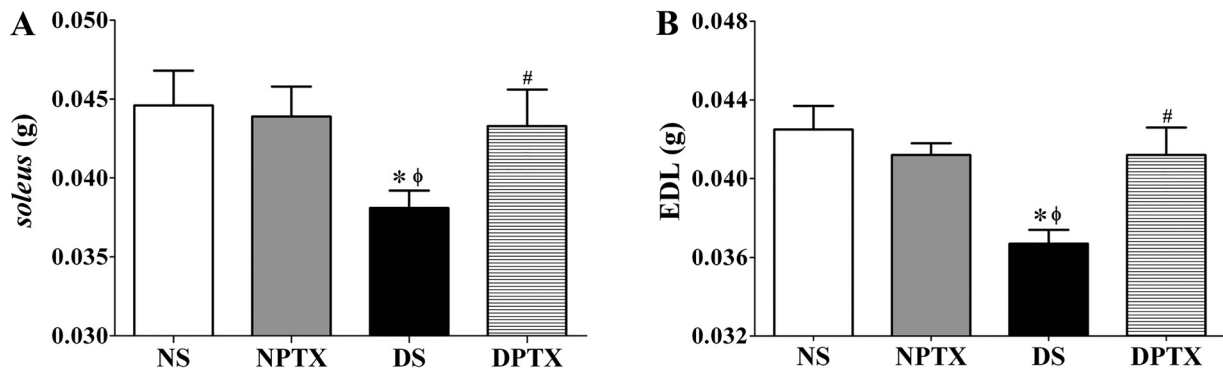


Fig. 1. Soleus (A) and extensor digitorum longus (EDL; B) skeletal muscle weights of normal and streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats after 3 days of pentoxifylline (PTX) treatment. Values are expressed as means ± SE; n = 8/group. Differences between groups were considered statistically significant if P < 0.05 and were analyzed with one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. *Significant difference compared with normal saline (NS) rats. φSignificant difference compared with normal pentoxifylline (NPTX). #Significant differences compared with diabetic saline (DS).

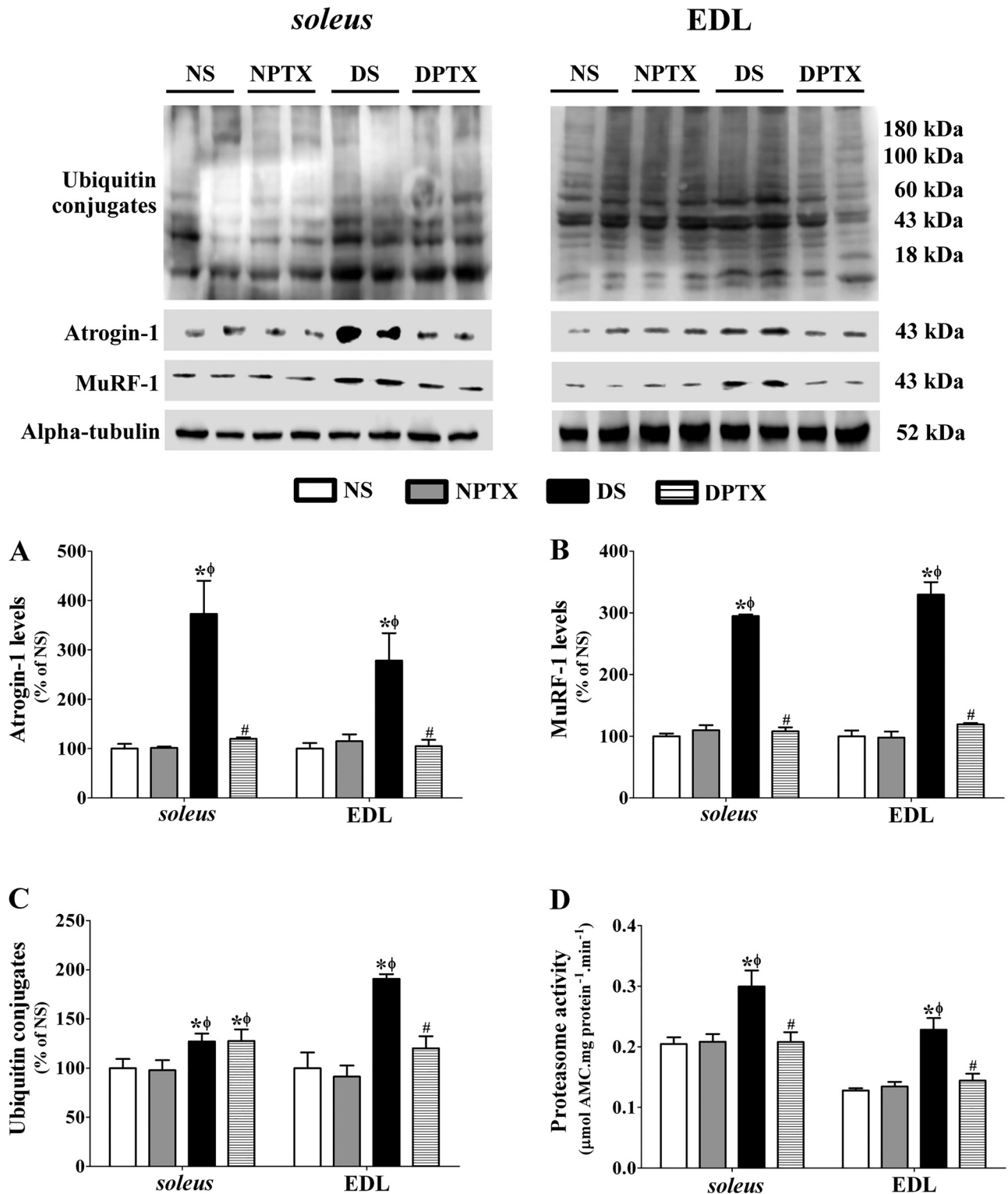


Fig. 2. Ubiquitin-proteasome system in skeletal muscles of normal and STZ-induced diabetic rats after 3 days of PTX treatment. Protein levels of atrogin-1 (A) and muscle RING finger-1 (MuRF-1) (B), ubiquitin conjugates levels (C), and chymotrypsin-like proteasome activity (D). Values are expressed as means \pm SE; $n = 8/\text{group}$. Differences between groups were considered statistically significant if $P < 0.05$ and were analyzed with one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. *Significant differences with NS. ϕ Significant differences with NPTX. #Significant differences with DS.

in the ubiquitin conjugates in EDL muscles of diabetic rats was practically prevented by PTX treatment, no changes were observed in the ubiquitin conjugate levels in the soleus of DPTX, which remained higher than values of DS rats (Fig. 2C).

The chymotrypsin-like activity of the proteasome was strongly inhibited in skeletal muscles of diabetic rats treated with PTX: the proteasome activity decreased in both the soleus (31%) and the EDL (37%) muscles of DPTX rats in comparison with values of DS rats (Fig. 2D), which remained close to values of normal NS rats.

Taken together, these data advance our understanding of the antiproteolytic effects of PTX on skeletal muscles of diabetic rats, demonstrating that the decreased expression of UPS components, mainly the E3 ubiquitin ligases, in association with the decreased proteasome activity, may be involved in the sparing effects of PTX on skeletal muscle mass in a wasting condition due to diabetes mellitus.

Caspase-3- and Calpain-Dependent Proteolysis

Both caspase-3 and calpains (also known as calcium-dependent proteases) are often associated with the establishment of skeletal muscle atrophies, since these proteases are involved in releasing proteins from myofibrils for subsequent ubiquitination and proteasome degradation.

In addition to the elevated expression of E3 ubiquitin ligases (Fig. 2), the increase in the ubiquitin conjugates (Fig. 2C) in both the soleus and the EDL muscles of DS rats can also be a consequence, at least in part, of the increased release of myofibrillar proteins, considering that the activities of caspase-3 (Fig. 3A) and calpains (Fig. 3B) were increased in the soleus (37% and 45%, respectively) and the EDL (twofold and 51%, respectively) of DS rats when compared with values of NS rats. The increases in the caspase-3 activities in muscles of DS rats were corroborated by the high levels of the cleaved form of caspase-3, in both the soleus (2.2-fold) and the EDL (2.1-fold) muscles (Fig. 3C). The increases in the calpain activities can be explained, at least in part, by the significant reduction in the levels of calpastatin (endogenous inhibitor of calpains), in the soleus (46%) and EDL (76%) muscles of DS rats (Fig. 3D).

No changes were observed in the activities of calpains (Fig. 3B) or in calpastatin levels (Fig. 3D) in skeletal muscles of NPTX rats in comparison with those of the control NS rats. However, treating normal rats with PTX promoted an unexpected increase in the cleaved form of caspase-3 in both the soleus (2.1-fold) and the EDL (36%) when compared with levels in NS rats (Fig. 3C), which reflected an increased caspase-3 activity in the soleus (39%), but not in the EDL of NPTX rats (Fig. 3A). However, even with the increases in the cleaved form (soleus, EDL) and activity (soleus) of caspase-3 in muscles of NPTX rats, these changes were not reflected in minor muscle weights (Fig. 1).

In comparison with the DS group, treating diabetic rats with PTX decreased the activities of calpains in both the soleus (51%) and the EDL (39%) muscles, which remained similar to values of normal rats (Fig. 3B). The increases observed in the protein levels of calpastatin in the soleus (86%) and EDL (3.5-fold) muscles of DPTX rats (Fig. 3D) support decreased calpain activity. An interesting result was observed in the caspase-3-dependent proteolysis in muscles of diabetic rats

treated with PTX: the treatment significantly reduced both the cleaved form (Fig. 3C) and the activity (Fig. 3A) of caspase-3 in EDL (43% and 51%, respectively); on the other hand, the same treatment did not change the levels of caspase-3 or its activity in the soleus, which remained higher than values of DS rats. However, it is important to note that even with this lack of effect on caspase-3-dependent proteolysis in the soleus, PTX treatment prevented the loss of mass in the soleus muscles of diabetic rats, suggesting that in the soleus, both the calpains and the UPS may be the main processes by which PTX exerts its antiproteolytic effects on DPTX rats. However, in EDL, both caspase-3- and calpain-mediated proteolysis are inhibited by PTX, offering fewer substrates for UPS proteolysis in DPTX rats.

Effects of the PTX Treatment on PDE Activity, cAMP Content, and EPAC/Akt Signaling

The treatment of normal and diabetic rats with PTX caused significant decreases in PDE activity, in both the soleus and the EDL muscles. PDE activity was decreased in the soleus (76%) and EDL (81%) of diabetic rats treated with PTX in comparison with values of diabetic rats treated with saline (Fig. 4A). Therefore, increases in cAMP levels were observed in skeletal muscles of normal and diabetic rats treated with PTX. The cAMP levels in the soleus and EDL of diabetic rats treated with PTX increased 34% and 45%, respectively, when compared with values of diabetic rats treated with saline (Fig. 4B). Diabetic state did not cause changes in PDE activity or in the cAMP content of muscles when compared with controls.

As the EPAC/Akt pathway has been recently proposed to be involved in the antiproteolytic responses related to cAMP signaling, we examined the effects of PTX treatments on the protein levels of EPAC1, an intracellular cAMP effector, and on the protein and phosphorylation levels of Akt (Thr-308 and Ser-473, both amino acid residues involved in Akt activation).

The levels of EPAC1 were significantly reduced in both the soleus (56%) and the EDL (46%) muscles of diabetic rats (Fig. 4C), suggesting that this cAMP effector should be controlled by insulin. Even without significant changes in the Akt protein levels, diabetes mellitus caused a significant decrease in Akt phosphorylation, in both the soleus (41% and 60% for Thr and Ser, respectively) and the EDL (57% and 83% for Thr and Ser, respectively) of DS rats in comparison with NS rats (Fig. 4, D and E). These decreases in the Akt activation in muscles of diabetic rats agree with the increased proteolysis leading to muscle mass loss, typical of the catabolic profile associated with insulin-deficient states.

Although PTX treatment significantly increased the cAMP content in the soleus and EDL of normal rats (Fig. 4B), no changes were observed in the EPAC1 levels (Fig. 4C), or in the Akt activation (Fig. 4, D and E) in either muscle, whose values remained similar to those of NS rats.

Treating diabetic rats with PTX caused profound changes in the levels of EPAC1 and Akt in skeletal muscles. In comparison with DS rats, the treatment of diabetic rats with PTX practically prevented the decrease in EPAC1, in both the soleus and the EDL muscles (Fig. 4C), whose levels remained similar to those of NS rats. As in the case of Akt activation, the phosphorylation of this kinase was significantly increased in both the soleus (42% and 73% for Thr and Ser, respectively)

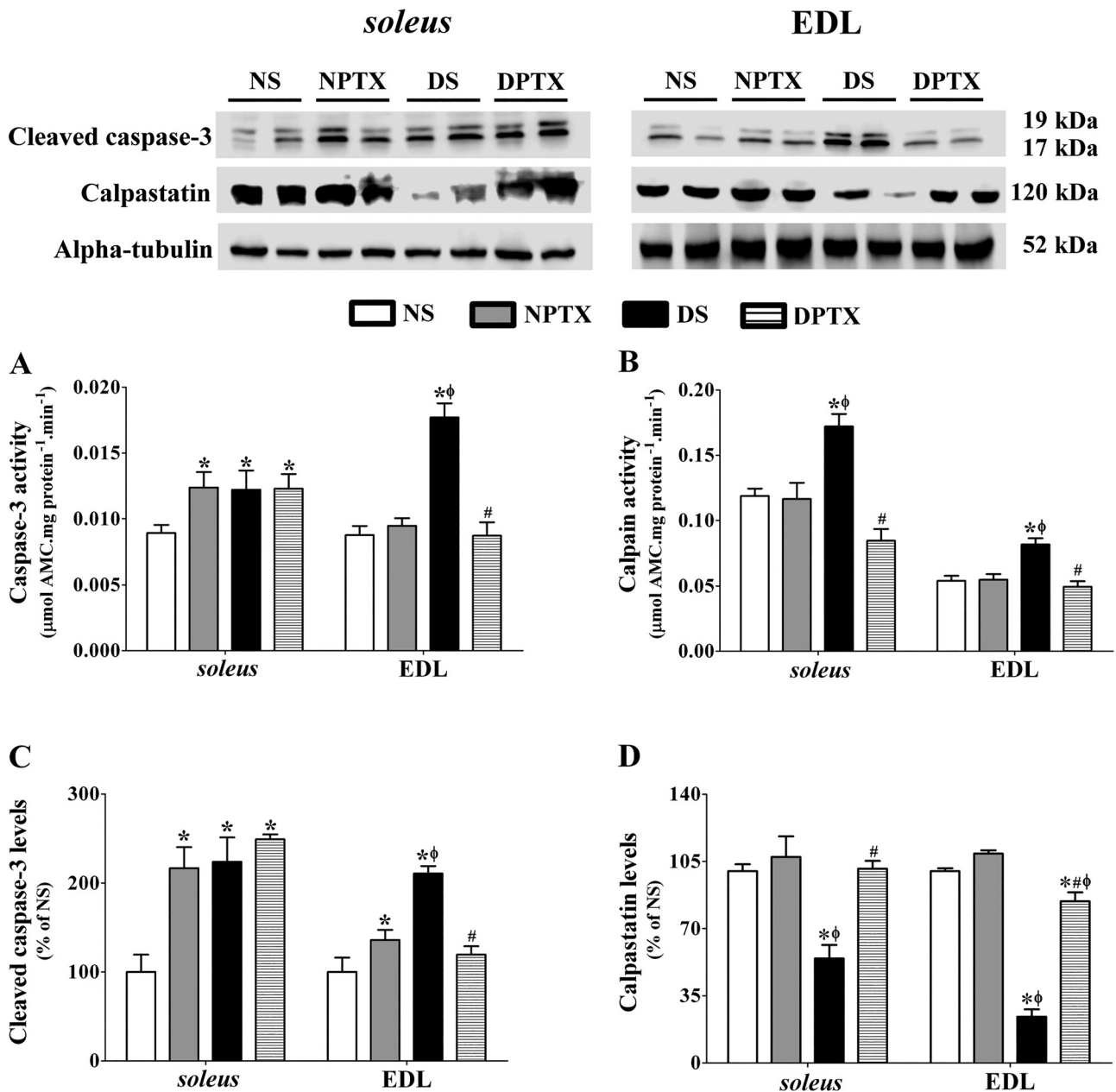


Fig. 3. Caspase-3- and calpain-dependent proteolysis in skeletal muscles of normal and STZ-induced diabetic rats after 3 days of PTX treatment. Activities of caspase-3 (A) and calpain (B), levels of cleaved caspase-3 (C), and protein levels of calpastatin (D). Values are expressed as means \pm SE; $n = 8/\text{group}$. Differences between groups were considered statistically significant if $P < 0.05$ and were analyzed with one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. *Significant differences with NS. ϕ Significant differences with NPTX. #Significant differences with DS.

and the EDL (66% and four-fold for Thr and Ser, respectively) muscles of diabetic rats treated with PTX (Fig. 4, D and E), without changes in total protein levels. These data suggest that the EPAC1/Akt pathway may be involved in the antiproteolytic responses of PTX in skeletal muscles of diabetic rats.

DISCUSSION

A previous study from our group showed that treating STZ-induced diabetic rats with PTX reduces protein breakdown in skeletal muscles, mainly via inhibiting both the ubiquitin-proteasome and the calcium-dependent proteolytic activities, with the involvement of intracellular pathways, de-

pending on the second messenger cAMP, independently of decreased TNF- α levels (5). The present study advances our understanding of the molecular basis related to the antiproteolytic potential of PTX by clarifying the specific components of proteolytic machineries controlled by this pharmacological intervention, as well as by elucidating the involvement of cAMP downstream effectors. Therefore, to the best of our knowledge, this study is the first to demonstrate the involvement of Akt in the antiproteolytic responses of PTX in atrophied skeletal muscles. This finding represents an important contribution that promotes the understanding of the changes caused by PTX treatment that lead to the inhibition of prote-

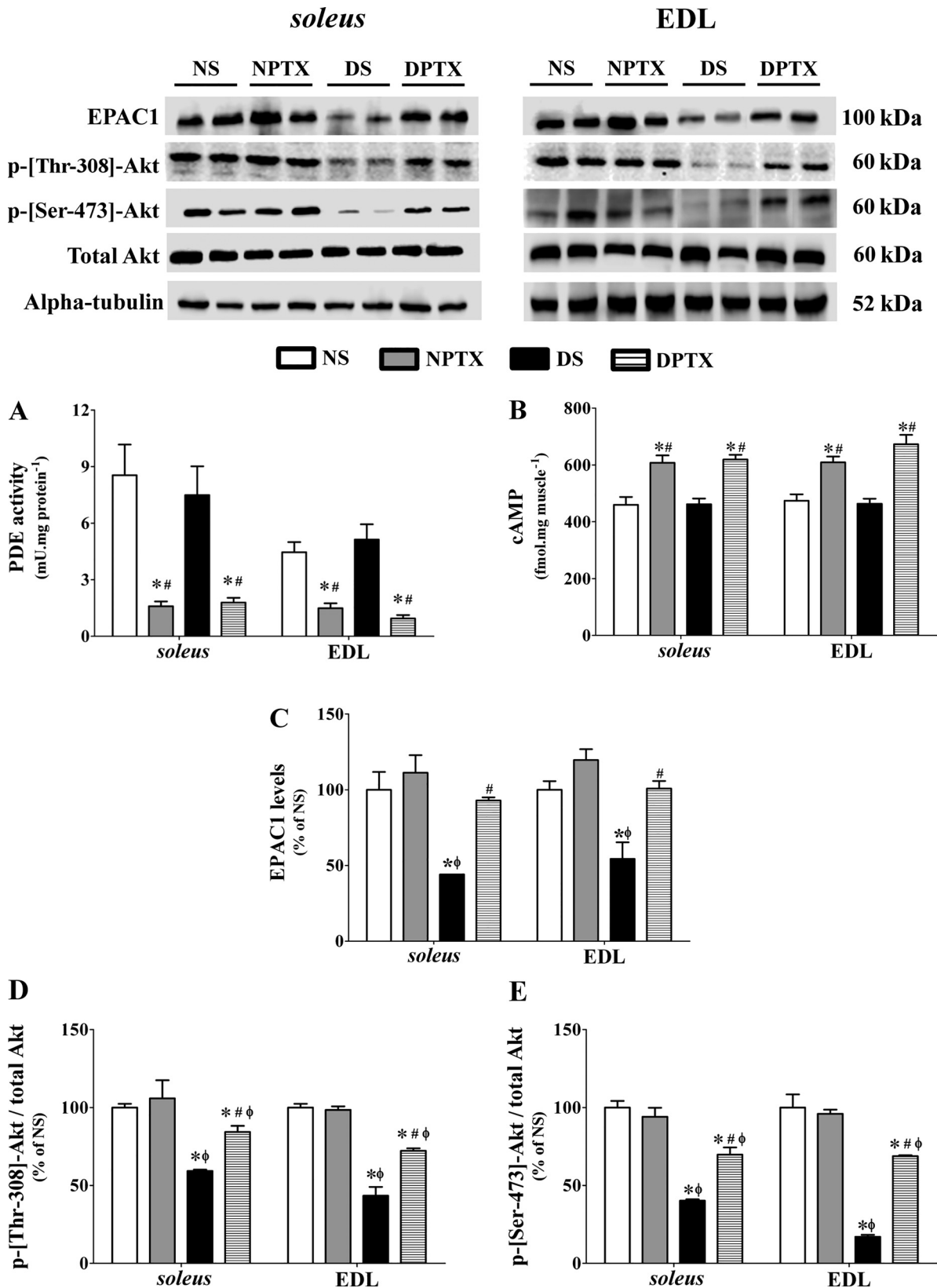


Fig. 4. Changes in intracellular effectors in skeletal muscles of normal and STZ-diabetic rats after 3 days of PTX treatment. Activity of PDE (A), content of cAMP (B), protein levels of exchange protein directly activated by cAMP (EPAC1; C), phosphorylation levels of Akt on Thr-308 (D), and Ser-473 (E) residues. Values are expressed as means ± SE; n = 8/group. Differences between groups were considered statistically significant if P < 0.05 and were analyzed with one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. *Significant differences with NS. φSignificant differences with NPTX. #Significant differences with DS.

olysis and avoid the loss of skeletal muscle mass in diabetic rats.

Nonselective and selective PDE inhibitors have been often cited as promising agents to prevent or attenuate skeletal muscle atrophies (16, 21). The anti-inflammatory action of PDE inhibitors may be helpful in attenuating skeletal muscle wasting during catabolic conditions (11, 18). In agreement with this, we found that the increased circulating levels of TNF- α in STZ-induced diabetic rats were significantly decreased after treatment with PTX (Table 1), which may contribute to both the reduction in the proteasome activity in the soleus and the EDL muscles (Fig. 2D) and the subsequent muscle mass preservation (Fig. 1). Increased TNF- α levels are often related with the catabolic profile of several conditions, leading to strong activation of UPS and muscle mass loss (47). Indirect PTX effects on preserving skeletal muscle mass via protecting pancreas function cannot be ignored. There is evidence that PTX treatment can maintain the morphology and reduce inflammatory markers in pancreas of diabetic animals (23), as well as increase circulating insulin levels (64). Considering that pancreas dysfunction caused by STZ (leading to a drastic reduction in insulin levels) is the main promoter of the acute skeletal muscle atrophy observed in the experimental model of diabetes mellitus (DM) used in this study, the effects of PTX on preserving pancreas function of diabetic animals deserve further exploration.

It has been consistently shown that increased intracellular cAMP levels are also important for the beneficial effects of PDE inhibitors on muscle mass preservation under different catabolic conditions (5, 33), which suggests that the antiproteolytic effect of PTX cannot be attributed exclusively to the TNF- α reduction. In the present study, we observed that treating diabetic rats with PTX strongly decreased the general activity of PDE in both the soleus and the EDL muscles (Fig. 4A), with a subsequent increase in cAMP levels (Fig. 4B). The increase observed in muscle cAMP levels were comparable with values found in our previous study (5), even though a smaller PTX dose was used here. The direct involvement of cAMP signaling in the antiproteolytic effect of PTX on skeletal muscles was first demonstrated when EDL muscles of normal and diabetic rats were incubated *in vitro* in the presence of PTX, which raised the cAMP levels and decreased the rate of overall proteolysis and the activities of the UPS and calcium-dependent proteolysis (5). Additionally, the concomitant incubation of skeletal muscles in the presence of PTX and H-89 (an inhibitor of PKA, cAMP-dependent protein kinase) blocks the antiproteolytic effects of PTX (5). Although in the present study we have no direct evidence of the *in vivo* PKA activation in skeletal muscles of diabetic rats treated with PTX, Silveira et al. (54) demonstrated a direct relationship between PKA activation and the inhibition of muscle proteolysis: EDL muscles of normal rats incubated *in vitro* in the presence of N⁶-benzoyladenine-3',5'-cyclic monophosphate (6-Bnz-cAMP, a specific PKA activator) exhibited decreased MuRF-1 expression and UPS activity.

The possibility of using cAMP signaling components as targets for novel and effective strategies to promote hypertrophic responses in skeletal muscles has appeared as an emerging trend (7), which can be extremely interesting for attenuating muscle wasting during catabolic conditions (39). The evidence of the cAMP involvement in the anabolic/anticatabolic effects

on protein metabolism goes back to studies conducted in the 1980s, which first demonstrated the role of β_2 -adrenergic agonists (β_2 AR) in promoting skeletal muscle mass gain (reviewed in Refs. 32, 38). Next, the pioneering study by Navegantes et al. (43) demonstrated the involvement of cAMP in the antiproteolytic responses of β_2 AR, showing reduced rates of total proteolysis in skeletal muscles of rats incubated *in vitro* with clenbuterol (β_2 AR agonist), but also with dibutyryl-cAMP (cAMP analog) or isobutylmethylxanthine (IBMX, a nonspecific PDE inhibitor). Decreases in calcium-dependent proteolysis (42) and in UPS activity (27) also occur upon β_2 AR treatment.

Considering all of this evidence, it is not surprising that β_2 ARs are being strongly suggested as potential targets to treat muscle wasting conditions (24, 62). On the other hand, it has been observed that the anabolic effects of β_2 AR can be distinct depending on the skeletal muscle type fiber, counteracting the use of β_2 AR for the attenuation of muscle atrophies. Ohnuki et al. (45) observed that treating mice with clenbuterol caused hypertrophy of the tibialis anterior (typical fast-twitch muscle) but not of the soleus (typical slow-twitch muscle). On the contrary, low doses of clenbuterol administered to senescent rats caused modest effects on mass gain in the soleus but no detectable effects on the plantaris (fast-twitch muscle) (14). In addition to these conflicting findings, some adverse cardiac and muscular events have been noted in both humans (13) and rodents (12) treated with β_2 AR agonists. Therefore, it seems interesting to explore novel pharmacological strategies to attenuate skeletal muscle atrophy that can activate the cAMP intracellular cascade in different muscles independently of the fiber type, that also reduce the possibility of adverse effects.

For all of these reasons, the present study focused on revisiting the antiproteolytic effect of PTX, studying its effects on both slow-twitch (soleus) and fast-twitch (EDL) muscles, for three main statements. First, PTX can increase the cAMP levels in muscles independently of β_2 AR stimulation, thereby inhibiting proteolysis, at least in a fast-twitch muscle (5). Second, the mechanisms by which PTX exerts antiproteolytic effects on skeletal muscles remain unknown. Finally, PTX has been strongly suggested for use in managing various complications related to diabetes mellitus, including diabetic nephropathy (8), foot ulcers due to diabetic neuropathy (48), and insulin resistance (30). Thus, understanding the benefits of PTX for sparing skeletal muscles could contribute to evidence supporting the repositioning of this drug for treating one more diabetic complication, as well as to attenuate the loss of muscle mass occurring in other catabolic conditions.

Despite all of the findings demonstrating the antiproteolytic responses after increases in cAMP, the downstream effectors of cAMP signaling controlling the proteolytic processes deserve further investigation. In this way, there is growing evidence about the involvement of cAMP signaling in Akt activation (10, 58). Once activated, Akt phosphorylates and inhibits FoxO1 and FoxO3 factors, thus reducing the transcription of two ubiquitin-ligases (E3), named "atrogenes," which are exclusively expressed in cardiac and skeletal striated muscles: atrogen-1 or MAFbx (muscle atrophy F-box) and MuRF-1 (muscle RING finger-1) (52, 57). The main consequence of this process is UPS inhibition, diminishing the loss of muscle mass. According to our data, the prevention of muscle mass loss in diabetic rats treated with PTX can be explained, at least in part,

by Akt activation. In the soleus and EDL muscles of DPTX rats, Akt phosphorylation levels increased (Thr-308 and Ser-473 residues, Fig. 4, *D* and *E*), and the expression of atrogin-1 (Fig. 2*A*) and MuRF-1 (Fig. 2*B*) decreased, when compared with levels observed in DS rats. These findings also corroborate the reduction observed in the ubiquitin conjugates (Fig. 2*C*), as well as the decrease in proteasome activity (Fig. 2*D*). In addition, the possibility of other UPS components being inhibited by PTX treatment cannot be excluded. It was previously demonstrated that the loss of muscle mass observed in skeletal muscles of Yoshida sarcoma-bearing rats was attenuated by PTX treatment via reduction in mRNA expression of UPS components, including ubiquitin, 14-kDa E2, C2 subunit of the 20S proteasome, and MSS1 (ATPase subunit of the 19S proteasome) (17). Altogether, it can be suggested that UPS inhibition via Akt activation is the main mechanism by which PTX alleviates the loss of muscle mass in STZ-induced diabetic rats.

The interaction between cAMP signaling and Akt activation in the promotion of antiproteolytic responses appears to be exerted via the cAMP sensor named “exchange protein directly activated by cAMP” (EPAC). A previous study by our group found that EDL muscles incubated *in vitro* with cyclic 8-(p-chlorophenylthio)-2'-*O*-methyladenosine-3',5'-monophosphate (8CPT-2Me-cAMP, an EPAC-selective agonist) exhibited reduced overall proteolysis, in association with Akt activation and inhibition of FoxO3 (4). In the present study, we have found significant falls in the EPAC1 levels in both the soleus and the EDL muscles (Fig. 4*C*) of diabetic rats. As far as we know, this is the first evidence of the consequences of diabetes mellitus on the protein levels of EPAC1, suggesting that this cAMP effector must be regulated by insulin, at least in skeletal muscles. Treating diabetic rats with PTX strongly increased the levels of EPAC1 (Fig. 4*C*), suggesting that the activation of this cAMP sensor may be the connection between the increase in the cAMP and the Akt activation promoted by PTX. Recently, increases were also observed in EPAC1 levels and in the Akt phosphorylation in EDL muscles of rats after burn injury and treatment with torbafylline, a nonspecific PDE inhibitor (33). A study by Ohnuki et al. (45), demonstrated that the increase in the mass of tibialis anterior in wild-type mice treated with clenbuterol was suppressed in Epac1 KO mice, with a significant decrease in Akt phosphorylation, providing evidence of EPAC1/Akt participation in the development of the hypertrophic responses mediated by cAMP signaling in skeletal muscles. The PTX-induced increase in the Akt phosphorylation in Thr-308 residue observed herein (Fig. 4*D*) is in agreement with the previous notion that cAMP/EPAC depends on upstream PI3K/PDK1 signaling to activate Akt. Indeed, Mei et al. (40) demonstrated that Akt activation in HEK293 cells transfected with EPAC and stimulated with forskolin or dibutyryl-cAMP was completely abolished in the presence of PI3K inhibitors, LY294002 and wortmannin. We have also noticed that Akt activation in EDL muscles incubated *in vitro* with epinephrine was also strongly reduced in the presence of wortmannin (4). The subsequent phosphorylation in Ser-473 residue fully activates Akt, which may be contributing to the PTX antiproteolytic effects on skeletal muscles of diabetic rats.

Although most studies have focused on searching for strategies that inhibit the UPS to prevent the loss of muscle mass during catabolic conditions, it must be emphasized that the

proteasome is unable to degrade intact myofibrils (55). Furthermore, myofibrillar proteins constitute ~55–60% of total muscle protein by weight, which are mainly degraded by the UPS (44). Therefore, the prior disassembly of myofibrils is a rate-limiting step for the myofibrillar protein ubiquitination and subsequent breakdown by the proteasome. Some studies have reported that both calpains (26) and caspases (20) release myofibrillar proteins for proteasomal degradation.

According to our present data, in addition to the fall in the UPS, the decreases in the activities of both caspase-3 (Fig. 3*A*) and calpain (Fig. 3*B*) may also contribute to the minor mass loss in EDL muscles of diabetic rats treated with PTX. In the soleus, it appears that the involvement of caspase-3-dependent proteolysis does not contribute to the PTX antiproteolytic responses, since both the caspase-3 cleaved levels (Fig. 3*C*) and activity (Fig. 3*A*) were unaffected by the PTX treatment. Consequently, the ubiquitinated conjugate levels were unchanged in the soleus muscles of DPTX rats (Fig. 2*C*). However, the decreases in atrogin expression and in the activities of proteasome and calpains should be sufficient to attenuate the loss of muscle mass in the soleus of diabetic rats treated with PTX. In EDL, although the decrease in the cleaved form of caspase-3 (Fig. 3*C*) explained, at least in part, the fall in its activity, the increased levels of calpastatin (Fig. 3*D*), an endogenous inhibitor of calpains, are concurrent with the decrease in the calpain activity. There is evidence of cAMP signaling promoting elevations in calpastatin expression (66). Reductions in caspase-3 activity have also been observed after treatments leading to increases of cAMP in skeletal muscles (49), although the involvement of Akt in reducing caspase-3 activity cannot be ruled out (22).

Altogether, at least for diabetic rats, it can be suggested that 1) the diminished availability of substrates due to reduced activities of calpains and caspase-3 and 2) the decrease in the levels of atrogin-1 and MuRF-1 culminate in a diminished rate of ubiquitination in muscles of diabetic rats treated with PTX, which ultimately reduce UPS proteolysis. Interestingly, in normal rats, PTX treatment raised levels of the cleaved form of caspase-3 in both the soleus and the EDL muscles (Fig. 3*C*), which was reflected in an increase in the activity of caspase-3 in the soleus, but not in the EDL (Fig. 3*A*). Insel et al. (31) reviewed evidence of the ability of cAMP to stimulate both proapoptotic and antiapoptotic responses; also, it seems that proapoptotic responses after cAMP increases are mediated mainly via PKA, while EPAC seems to be preferentially related to antiapoptotic responses. Therefore, considering that increases in EPAC levels were found only in muscles of diabetic rats treated with PTX (Fig. 4*C*), the distinct changes in the caspase-3 proteolysis observed in muscles of NPTX and DPTX rats may be a consequence of the differential participation of cAMP downstream effectors involved in controlling apoptotic machinery.

In summary, the findings of the present study showed that the antiproteolytic responses of PTX in skeletal muscles of diabetic rats are related to the integration of the following mechanisms: 1) the decrease in the activities of calpains and caspase-3, which, in turn, diminishes the release of proteins from myofibrils, disposing fewer substrates for proteasomal degradation and 2) the decrease in the expression of key components of the UPS proteolysis, mainly MuRF-1 and atrogin-1, leading to a decrease in the ubiquitination process

and in the proteasome activity. Our findings also substantiate the involvement of cAMP signaling in at least part of the PTX antiproteolytic effects on skeletal muscles, since treatment with PTX increased cAMP levels in association with a rise in EPAC levels. It can be suggested that the Akt activation in muscles of diabetic rats treated with PTX may be related with the cAMP/EPAC signaling. Akt activation seems to integrate the responses related to the inhibition of both calcium/caspase-3-proteolysis and the UPS, thereby attenuating the loss of skeletal muscle mass in diabetic rats treated with PTX. Moreover, considering the fundamental role of proteolytic systems in protein quality control, degrading proteins damaged by oxidative and glycation stress, further investigations are also necessary to understand the effects of inhibiting muscle proteolysis by PTX regarding the levels of biomarkers of oxidative and glycation damage in proteins, mainly in DM. During conditions of glycation stress, it has been observed that both lysosomal proteolysis and UPS act synergistically to degrade advanced glycation end products (AGEs) (61). In addition to the classical DM complications related to AGEs, increased AGE levels have been also recently associated with the promotion of skeletal muscle atrophy and dysfunction (15, 41).

Taken together, the findings of this study contribute to an emerging trend, focused on searching for novel and effective strategies to promote anticatabolic responses in the protein metabolism of skeletal muscles, highlighting the cAMP signaling, as quoted by Berdeaux and Stewart (7): “A potentially more promising avenue is identification of skeletal muscle-specific cAMP effector pathways that can be selectively targeted to promote hypertrophy and muscle regeneration after injury. Such targets could be used in patients with a wide variety of pathological conditions, such as muscular dystrophy or atrophy due to aging, immobilization, cachexia, and nerve or muscle damage.” The comprehension of the mechanisms explaining the antiproteolytic effects of PTX highlights the need for ongoing investigations, contributing to repositioning this drug for the treatment of muscle wasting conditions.

GRANTS

We thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Grant 2013/18861-2), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant 479817/2013-8), and Scientific Support and Development Program of School of Pharmaceutical Sciences of UNESP (PADC/FCFAr/UNESP, 26/2013) for the financial support grants. During this study, C. A. Arcaro received a scholarship from the FAPESP (2014/12202-0).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.A.A., I.L.B., and A.M.B. conceived and designed research; C.A.A., R.P.A., N.M.Z., and S.P.-G. performed experiments; C.A.A., R.P.A., S.P.-G., L.C.N., I.C.K., I.L.B., and A.M.B. analyzed data; C.A.A. and A.M.B. interpreted results of experiments; C.A.A., R.P.A., and A.M.B. prepared figures; C.A.A., R.P.A., S.P.-G., L.C.N., I.C.K., I.L.B., and A.M.B. edited and revised manuscript; C.A.A., R.P.A., N.M.Z., S.P.-G., L.C.N., I.C.K., I.L.B., and A.M.B. approved final version of manuscript; A.M.B. drafted manuscript.

REFERENCES

- Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 3: 673–683, 2004. doi:10.1038/nrd1468.
- Asp ML, Tian M, Wendel AA, Belury MA. Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. *Int J Cancer* 126: 756–763, 2010. doi:10.1002/ijc.24784.
- Bailey JL, Zheng B, Hu Z, Price SR, Mitch WE. Chronic kidney disease causes defects in signaling through the insulin receptor substrate/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: implications for muscle atrophy. *J Am Soc Nephrol* 17: 1388–1394, 2006. doi:10.1681/ASN.2004100842.
- Baviera AM, Zanon NM, Navegantes LC, Kettelhut IC. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol* 315: 104–112, 2010. doi:10.1016/j.mce.2009.09.028.
- Baviera AM, Zanon NM, Carvalho Navegantes LC, Migliorini RH, do Carmo Kettelhut I. Pentoxifylline inhibits Ca²⁺-dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E702–E708, 2007. doi:10.1152/ajpendo.00147.2006.
- Bell RA, Al-Khalaf M, Megoney LA. The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. *Skelet Muscle* 6: 6–16, 2016. doi:10.1186/s13395-016-0076-8.
- Berdeaux R, Stewart R. cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303: E1–E17, 2012. doi:10.1152/ajpendo.00555.2011.
- Bhanot S, Leehey DJ. Pentoxifylline for diabetic nephropathy: an important opportunity to re-purpose an old drug? *Curr Hypertens Rep* 18: 8, 2016. doi:10.1007/s11906-015-0612-7.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3: 1014–1019, 2001. doi:10.1038/ncb1101-1014.
- Brennesvik EO, Ktori C, Ruzzin J, Jebens E, Shepherd PR, Jensen J. Adrenaline potentiates insulin-stimulated PKB activation via cAMP and Epac: implications for cross talk between insulin and adrenaline. *Cell Signal* 17: 1551–1559, 2005. doi:10.1016/j.cellsig.2005.03.011.
- Breuillé D, Farge MC, Rosé F, Arnal M, Attaix D, Obled C. Pentoxifylline decreases body weight loss and muscle protein wasting characteristics of sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 265: E660–E666, 1993. doi:10.1152/ajpendo.1993.265.4.E660.
- Burniston JG, Ng Y, Clark WA, Colyer J, Tan LB, Goldspink DF. Myotoxic effects of clenbuterol in the rat heart and soleus muscle. *J Appl Physiol* (1985) 93: 1824–1832, 2002. doi:10.1152/japplphysiol.00139.2002.
- Cazzola M, Matera MG. Tremor and β_2 -adrenergic agents: is it a real clinical problem? *Pulm Pharmacol Ther* 25: 4–10, 2012. doi:10.1016/j.pupt.2011.12.004.
- Chen KD, Alway SE. A physiological level of clenbuterol does not prevent atrophy or loss of force in skeletal muscle of old rats. *J Appl Physiol* (1985) 89: 606–612, 2000. doi:10.1152/jappl.2000.89.2.606.
- Chiu CY, Yang RS, Sheu ML, Chan DC, Yang TH, Tsai KS, Chiang CK, Liu SH. Advanced glycation end-products induce skeletal muscle atrophy and dysfunction in diabetic mice via a RAGE-mediated, AMPK-down-regulated, Akt pathway. *J Pathol* 238: 470–482, 2016. doi:10.1002/path.4674.
- Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nat Rev Drug Discov* 14: 58–74, 2015. doi:10.1038/nrd4467.
- Combaret L, Rallièrre C, Taillandier D, Tanaka K, Attaix D. Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing rats. *Mol Biol Rep* 26: 95–101, 1999. doi:10.1023/A:1006955832323.
- Combaret L, Tilignac T, Claustre A, Voisin L, Taillandier D, Obled C, Tanaka K, Attaix D. Torbafylline (HWA 448) inhibits enhanced skeletal muscle ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in cancer and septic rats. *Biochem J* 361: 185–192, 2002.
- Douillard A, Galbes O, Begue G, Rossano B, Levin J, Vernus B, Bonnier A, Candau R, Py G. Calpastatin overexpression in the skeletal muscle of mice prevents clenbuterol-induced muscle hypertrophy and phenotypic shift. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39: 364–372, 2012. doi:10.1111/j.1440-1681.2012.05677.x.
- Du J, Wang X, Mierles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, Price SR, Mitch WE. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* 113: 115–123, 2004. doi:10.1172/JCI18330.

21. Dutt V, Gupta S, Dabur R, Injeti E, Mittal A. Skeletal muscle atrophy: potential therapeutic agents and their mechanisms of action. *Pharmacol Res* 99: 86–100, 2015. doi:10.1016/j.phrs.2015.05.010.
22. Gao Y, Ordas R, Klein JD, Price SR. Regulation of caspase-3 activity by insulin in skeletal muscle cells involves both PI3-kinase and MEK-1/2. *J Appl Physiol* (1985) 105: 1772–1778, 2008. doi:10.1152/jappphysiol.90636.2008.
23. Garcia FA, Pinto SF, Cavalcante AF, Lucetti LT, Menezes SM, Felipe CF, Alves AP, Brito GA, Cerqueira GS, Viana GS. Pentoxifylline decreases glycemia levels and TNF- α , iNOS and COX-2 expressions in diabetic rat pancreas. *Springerplus* 3: 283, 2014. doi:10.1186/2193-1801-3-283.
24. Giovannetti AM, Pasanisi MB, Černiauskaite M, Bussolino C, Leonard M, Morandi L. Perceived efficacy of salbutamol by persons with spinal muscular atrophy: A mixed methods study. *Muscle Nerve* 54: 843–849, 2016. doi:10.1002/mus.25102.
25. Glass DJ. PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Curr Top Microbiol Immunol* 346: 267–278, 2010. doi:10.1007/82_2010_78.
26. Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci* 86 Suppl: E19–E35, 2008. doi:10.2527/jas.2007-0395.
27. Gonçalves DA, Lira EC, Baviera AM, Cao P, Zanon NM, Arany Z, Bedard N, Tanksale P, Wing SS, Lecker SH, Kettelhut IC, Navegantes LC. Mechanisms involved in 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. *Endocrinology* 150: 5395–5404, 2009. doi:10.1210/en.2009-0428.
28. Haan C, Behrmann I. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *J Immunol Methods* 318: 11–19, 2007. doi:10.1016/j.jim.2006.07.027.
29. Haddad F, Adams GR. Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* (1985) 100: 1188–1203, 2006. doi:10.1152/jappphysiol.01227.2005.
30. Han SJ, Kim HJ, Kim DJ, Sheen SS, Chung CH, Ahn CW, Kim SH, Cho YW, Park SW, Kim SK, Kim CS, Kim KW, Lee KW. Effects of pentoxifylline on proteinuria and glucose control in patients with type 2 diabetes: a prospective randomized double-blind multicenter study. *Diabetol Metab Syndr* 7: 64, 2015. doi:10.1186/s13098-015-0060-1.
31. Insel PA, Zhang L, Murray F, Yokouchi H, Zambon AC. Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol (Oxf)* 204: 277–287, 2012. doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02273.x.
32. Joassard OR, Durieux AC, Freyssen DG. β_2 -Adrenergic agonists and the treatment of skeletal muscle wasting disorders. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 2309–2321, 2013. doi:10.1016/j.biocel.2013.06.025.
33. Joshi R, Kadeer N, Sheriff S, Friend LA, James JH, Balasubramaniam A. Phosphodiesterase (PDE) inhibitor torbafylline (HWA 448) attenuates burn-induced rat skeletal muscle proteolysis through the PDE4/cAMP/EPAC/PI3K/Akt pathway. *Mol Cell Endocrinol* 393: 152–163, 2014. doi:10.1016/j.mce.2014.06.012.
34. Klaude M, Fredriksson K, Tjäder I, Hammarqvist F, Ahlman B, Rooyackers O, Wernerman J. Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis. *Clin Sci (Lond)* 112: 499–506, 2007. doi:10.1042/CS20060265.
35. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685, 1970. doi:10.1038/227680a0.
36. Li J, Lu Z. An integrative approach for discovery of new uses of existing drugs. *Data Sci J* 14: 9, 2015. doi:10.5334/dsj-2015-009.
37. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951.
38. Lynch GS, Ryall JG. Role of β -adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev* 88: 729–767, 2008. doi:10.1152/physrev.00028.2007.
39. Mack SG, Cook DJ, Dhurjati P, Butchbach ME. Systems biology investigation of cAMP modulation to increase SMN levels for the treatment of spinal muscular atrophy. *PLoS One* 9: e115473, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0115473.
40. Mei FC, Qiao J, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Quilliam LA, Cheng X. Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *J Biol Chem* 277: 11,497–11,504, 2002. doi:10.1074/jbc.M110856200.
41. Mori H, Kuroda A, Araki M, Suzuki R, Taniguchi S, Tamaki M, Akehi Y, Matsuhisa M. Advanced glycation end-products are a risk for muscle weakness in Japanese patients with type 1 diabetes. *J Diabetes Investig* 8: 377–382, 2017. doi:10.1111/jdi.12582.
42. Navegantes LC, Resano NM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Catecholamines inhibit Ca^{2+} -dependent proteolysis in rat skeletal muscle through β_2 -adrenoceptors and cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E449–E454, 2001. doi:10.1152/ajpendo.2001.281.3.E449.
43. Navegantes LC, Resano NM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E663–E668, 2000. doi:10.1152/ajpendo.2000.279.3.E663.
44. Neti G, Novak SM, Thompson VF, Goll DE. Properties of easily releasable myofilaments: are they the first step in myofibrillar protein turnover? *Am J Physiol Cell Physiol* 296: C1383–C1390, 2009. doi:10.1152/ajpcell.00022.2009.
45. Ohnuki Y, Umeki D, Mototani Y, Shiozawa K, Nariyama M, Ito A, Kawamura N, Yagisawa Y, Jin H, Cai W, Suita K, Saeki Y, Fujita T, Ishikawa Y, Okumura S. Role of phosphodiesterase 4 expression in the Epac1 signaling-dependent skeletal muscle hypertrophic action of clenbuterol. *Physiol Rep* 4: e12791, 2016. doi:10.14814/phy2.12791.
46. Peter AK, Crosbie RH. Hypertrophic response of Duchenne and limb-girdle muscular dystrophies is associated with activation of Akt pathway. *Exp Cell Res* 312: 2580–2591, 2006. doi:10.1016/j.yexcr.2006.04.024.
47. Reid MB, Li YP. Tumor necrosis factor- α and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res* 2: 269–272, 2001. doi:10.1186/rm67.
48. Rewale V, Prabhakar KR, Chitale AM. Pentoxifylline: a new armamentarium in diabetic foot ulcers. *J Clin Diagn Res* 8: 84–86, 2014. doi:10.7860/JCDR/2014/7856.3984.
49. Russell ST, Tisdale MJ. Mechanism of attenuation of skeletal muscle atrophy by zinc- α^2 -glycoprotein. *Endocrinology* 151: 4696–4704, 2010. doi:10.1210/en.2010-0532.
50. Sakuma K, Aoi W, Yamaguchi A. Molecular mechanism of sarcopenia and cachexia: recent research advances. *Pflügers Arch* 469: 573–591, 2017. doi:10.1007/s00424-016-1933-3.
51. Sandri M, Barberi L, Bijlsma AY, Blaauw B, Dyar KA, Milan G, Mammucari C, Meskers CG, Pallafacchina G, Paoli A, Pion D, Roceri M, Romanello V, Serrano AL, Toniolo L, Larsson L, Maier AB, Muñoz-Cánoves P, Musarò A, Ponde M, Reggiani C, Rizzuto R, Schiaffino S. Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle: the role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. *Biogerontology* 14: 303–323, 2013. doi:10.1007/s10522-013-9432-9.
52. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk A, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117: 399–412, 2004. doi:10.1016/S0092-8674(04)00400-3.
53. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)* 23: 160–170, 2008. doi:10.1152/physiol.00041.2007.
54. Silveira WA, Gonçalves DA, Graça FA, Andrade-Lopes AL, Bergantin LB, Zanon NM, Godinho RO, Kettelhut IC, Navegantes LC. Activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis: implications for sympathetic regulation. *J Appl Physiol* (1985) 117: 11–19, 2014. doi:10.1152/jappphysiol.01055.2013.
55. Solomon V, Goldberg AL. Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem* 271: 26690–26697, 1996. doi:10.1074/jbc.271.43.26690.
56. Steffen BT, Lees SJ, Booth FW. Anti-TNF treatment reduces rat skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia. *J Appl Physiol* (1985) 105: 1950–1958, 2008. doi:10.1152/jappphysiol.90884.2008.
57. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* 14: 395–403, 2004. doi:10.1016/S1097-2765(04)00211-4.
58. Stuenkel JC, Bolling A, Ingvaldsen A, Romundstad C, Sudar E, Lin FC, Lai YT, Jensen J. β -adrenoceptor stimulation potentiates insulin-stimulated PKB phosphorylation in rat cardiomyocytes via cAMP and PKA. *Br J Pharmacol* 160: 116–129, 2010. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00677.x.
59. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350–4354, 1979. doi:10.1073/pnas.76.9.4350.

60. **Trinder P.** Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *J Clin Pathol* 22: 246, 1969. doi:10.1136/jcp.22.2.246-b.
61. **Uchiki T, Weikel KA, Jiao W, Shang F, Caceres A, Pawlak D, Handa JT, Brownlee M, Nagaraj R, Taylor A.** Glycation-altered proteolysis as a pathobiologic mechanism that links dietary glycemic index, aging, and age-related disease (in nondiabetics). *Aging Cell* 11: 1–13, 2012. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00752.x.
62. **Umeki D, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Suita K, Fujita T, Nakamura Y, Saeki Y, Okumura S.** Protective effects of clenbuterol against dexamethasone-induced masseter muscle atrophy and myosin heavy chain transition. *PLoS One* 10: e0128263, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0128263.
63. **Wilkes EA, Selby AL, Atherton PJ, Patel R, Rankin D, Smith K, Rennie MJ.** Blunting of insulin inhibition of proteolysis in legs of older subjects may contribute to age-related sarcopenia. *Am J Clin Nutr* 90: 1343–1350, 2009. doi:10.3945/ajcn.2009.27543.
64. **Ye JH, Chao J, Chang ML, Peng WH, Cheng HY, Liao JW, Pao LH.** Pentoxifylline ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in hyperglycaemic and dyslipidaemic mice by upregulating fatty acid β -oxidation. *Sci Rep* 6: 33102, 2016. doi:10.1038/srep33102.
65. **Zein CO, Lopez R, Fu X, Kirwan JP, Yerian LM, McCullough AJ, Hazen SL, Feldstein AE.** Pentoxifylline decreases oxidized lipid products in nonalcoholic steatohepatitis: new evidence on the potential therapeutic mechanism. *Hepatology* 56: 1291–1299, 2012. doi:10.1002/hep.25778.
66. **Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M.** Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 4459–4464, 2005. doi:10.1073/pnas.0501076102.

