

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.

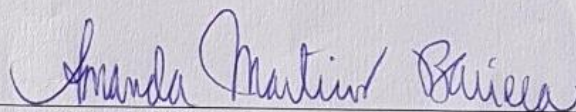
CARLOS ALBERTO ARCARO FILHO

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

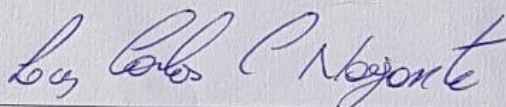
Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista –
UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a
obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 27 de abril de 2018.

BANCA EXAMINADORA



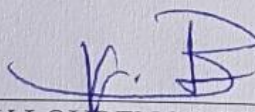
AMANDA MARTINS BAVIERA - Orientadora



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 atrogen-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;
β_2-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.

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.; NAVGANTES, 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.; NAVGANTES, 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.