

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS NO MÚSCULO EXTENSOR LONGO
DOS DEDOS DE RATOS EM CRESCIMENTO SUBMETIDOS À DIETA
HIPOPROTEICA-HIPERGLICÍDICA.**

MAÍSA PAVANI DOS SANTOS ELIAS

CUIABÁ

2016

**SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS NO MÚSCULO EXTENSOR LONGO
DOS DEDOS DE RATOS EM CRESCIMENTO SUBMETIDOS À DIETA
HIPOPROTEICA-HIPERGLICIDICA.**

MAÍSA PAVANI DOS SANTOS ELIAS

Orientadora: Profa Dra. Nair Honda Kawashita

Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Marlise Balbinotti Andrade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, para obtenção do título de doutor
em Ciências da Saúde, área de concentração Cirurgia
e Metabolismo.

CUIABÁ

2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TERMO DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO/TESE PELO ORIENTADOR

Eu, Nair Honda Kawashita, pelo presente termo declaro ter feito a devida revisão da Tese "Síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético extensor longo dos dedos de ratos em crescimento submetidos a dieta hipoproteica-hiperglicídica", de autoria do doutorando(a) Maísa Pavani dos Santos Elias, do(a) qual fui orientador e certifiquei de que todas as orientações, sugestões e necessidades de correções feitas pela Banca Examinadora da Defesa foram acatadas e cumpridas. Sendo assim, o texto está pronto para ser entregue à Coordenação de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FM/UFMT na forma de arquivo eletrônico em PDF.

Além disso, confirmo que o resultado da pesquisa objeto da Dissertação/Tese foi encaminhado para publicação no Periódico *Journal of Nutritional Biochemistry*, estando o Mestrando(o)/Doutorando(a) liberado(a) para prosseguir com a tramitação, junto à CPPG/FM/UFMT, para a obtenção do seu Diploma de Mestre/Doutor.

Portanto, autorizo a entrega dos CDs com o arquivo eletrônico da mesma.

Data: 02./09./2016

Prof(a) Dr(a) Nair Honda Kawashita

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

P337s Elias, Maísa Pavani dos Santos.
Síntese e degradação de proteínas no músculo extensor longo dos dedos de ratos em crescimento submetidos à dieta hipoproteica-hiperglicídica. / Maísa Pavani dos Santos Elias. --2016
105 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Nair Honda Kawashita.
Co-orientadora: Claudia Marlise Balbinotti Andrade.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Cuiabá, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Dieta hipoproteica-hiperglicídica. 2. Músculo extensor longo dos dedos. 3. Síntese de proteínas. 4. Vias proteolíticas. 5. Ratos em crescimento. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada à fonte.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao meu grande Deus pela minha vida, por minha família, pelo seu amor incondicional, pelo sustento diário, proteção e socorro bem presente na hora da angústia;
- ✓ A Profa. Dra. Nair Honda Kawashita, minha orientadora e amiga, pelos inúmeros ensinamentos e valiosos conselhos, por sempre estar disposta e presente em todas as etapas desse trabalho científico (até mesmo nos fins de semana e feriado), por ter me acolhido por todos esses anos no Laboratório de Bioquímica e me mostrado o caminho da verdadeira ciência e acima de tudo pela paciência, presteza, apoio, alegrias, carinho, confiança a mim depositados, pela capacidade de fazer as dificuldades e obstáculos desaparecerem e pela sabedoria em me ensinar a construir meu próprio caminho. A senhora, meu eterno agradecimento pela amizade, compreensão e seriedade em todos os momentos. Não consigo encontrar palavras ou demonstrar em atitudes toda gratidão que tenho pela senhora.
- ✓ A Profa. Dra. Cláudia Marlise Balbinotti Andrade, minha coorientadora pelas orientações, correções, colaboração e confiança em todas as etapas da realização desse trabalho;
- ✓ A Profa Dra Suélem de França Lemes, minha amiga-irmã, pelos momentos de alegria, por me emprestar seu ombro nos momentos de dificuldade, pelo carinho, grande amizade, cumplicidade, pela convivência agradável e harmoniosa, pelo ajuda nos experimentos, pelos sinceros conselhos, pelo respeito, pelas orações e por todos os incentivos que sempre me deu na busca dos meus sonhos. Você e sua família são muito importantes para mim e minha família. Não tenho palavras para agradecê-lá;
- ✓ Ao meu marido Hugo Jorge dos Santos Elias e ao meu filho Hugo Gabriel por todo amor, carinho, incentivo, compreensão nas ausências, por tolerarem os momentos de estresse e cansaço, por me fortalecerem nos momentos de desânimo, pelos momentos de alegrias, descontração e por toda ajuda e presença nas diferentes circunstâncias. Não sei o que seria minha vida sem vocês ao meu lado.
- ✓ A base da vida “meus pais” e minha irmã Michelle Pavani por serem os responsáveis pela criação do meu caráter e educação, por me transmitirem ânimo, proteção e me ensinarem a aceitar as coisas que não posso modificar e a ter coragem para modificar aquelas que eu podia. Meus sinceros agradecimentos, a DEUS, por ter vocês ao meu lado.
- ✓ As Profas. Dra. Márcia Queiroz Latorraca e Dra. Maria Helena Gaíva Gomes da Silva por aceitarem participar da banca de defesa, pelo apoio, pelas contribuições, atenção e disponibilidade em todos os momentos.
- ✓ A Profa. Dra. Valéria Ernestânia Chaves, uma pessoa que admiro muito, meu muito obrigado pela sua pronta disposição em participar da banca de defesa, pelas importantes contribuições, pela troca de experiências e por toda ajuda em todos os momentos que precisamos de você.
- ✓ A Profa Dra. Denise Rangel da Silva Sartori pelas sugestões, pela pronta disponibilidade em participar da banca de defesa, por toda competência e troca de experiências.
- ✓ Ao Air Francisco, pelo auxílio, presteza, amizade, entusiasmo, harmonia e momentos de descontração.
- ✓ Ao Celso Roberto Afonso, pelo apoio, auxílio paciência e disponibilidade em todos os momentos.

- ✓ As minhas queridas amigas Francielly Correia, Thaís Santos Queiroz, Ana Paula e Mendalli Froellich pessoas que aprendi a amar, pela amizade, por todo conforto, pelo carinho, por terem me ajudado a realizar todos os experimentos, pela paciência em ouvir algumas vezes as mesmas coisas, pelas orações, por apoiar meus ideais e me transmitir coragem, por terem transformado nosso ambiente de pesquisa em um ambiente familiar, repleto de harmonia, alegria e emoções. A vocês minha eterna gratidão!
- ✓ Aos colegas do Laboratório de Bioquímica: Fhelipe Jolner, Damiana Luiza, Willian Kume, Gabriela Matos, Eslaine Patrícia, Edgar Willibaldo, Flávia Hoshaki e Mayara Peron pelo auxílio, generosidade, pela disposição em ajudar e pela paciência diante dos desencontros.
- ✓ A minha amiga Rosângela Madalena Ferreira por estar ao meu lado em todos os momentos, me incentivando e dando força para lutar por meus ideais, por sempre acreditar que eu podia, por dividir comigo nossos segredos e acima de tudo pela amizade extremamente sincera, agradável e confortadora. A você minha imensa admiração!
- ✓ Ao Eudes Ávila e Thiago Lima pela amizade, pela ajuda nos experimentos, pelo apoio e pelo exemplo de disposição.
- ✓ A todos os meus familiares.
- ✓ A CAPES, ao CNPq e a FAPEMAT pelo apoio financeiro.
- ✓ A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.
- ✓ Ao pessoal do Biotério, em nome do prof. Msc. Benedito Luiz Figueiredo.
- ✓ A Universidade Federal de Mato Grosso.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1 Características gerais do músculo esquelético.....	13
1.2 Síntese de proteínas.....	16
1.3 Degradação de proteínas.....	25
1.3.1 Sistema proteolítico lisossomal.....	26
1.3.2 Sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma.....	28
1.3.3 Sistema proteolítico dependente de Ca^{2+}	30
1.3.4 Sistema proteolítico residual ou mediado por caspase-3.....	31
1.3.5 Regulação do sistema proteolítico.....	32
1.4 Dieta hipoproteica-hiperglicídica.....	33
2. OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
4. ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	47
5. ARTIGO EM INGLÊS.....	76
6. ANEXO.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP1 - Proteína de ligação 1 do fator de iniciação eucariótico 4

ADP – Adenosina difosfato

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida

AIN – American Institute of Nutrition

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

AMPK - Proteína quinase dependente de adenosina monofosfato

ATF-4 – Fator ativador de transcrição 4

Atg - Proteínas relacionadas à autofagia

ATP– Adenosina trifosfato

C - Controle

CREB – Proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc

E1- Enzima ativadora de ubiquitina

E2 – Enzima conjugadora de ubiquitina

E3 – Enzima ligadora de ubiquitina

EDL – Extensor longo dos dedos

eIF – Fator de iniciação eucariótico

eIF2 - Fator de iniciação eucariótico 2

eIF3 - Fator de iniciação eucariótico 3

eIF4A - Fator de iniciação eucariótico 4 A

eIF4F - Fator de iniciação eucariótico 4E

eIF4F - Fator de iniciação eucariótico 4F

eIF4F - Fator de iniciação eucariótico 4G

EPI – Tecido adiposo branco epididimal

FoXO- Fatores de transcrição “*Forkhead*” da família da FoxO

GABARAP - Proteína associada ao receptor do ácido gama-aminobutírico

GAP – Proteína ativadora de GTPases

GATE-16 - *Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*

GDP - Guanosina difosfato

G_s - Proteína G estimulatória ligadora de nucleotídeos

GSK-3 - Glicogênio sintase quinase-3β

GTP – Guanosina trifosfato

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IR – Receptor de insulina

IRS1 – Substrato 1 do receptor de insulina

LC3 - Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos

LPHC – Low-protein; high carbohydrate ou hipoproteico-hiperglicídico

MAFbx - *Muscle atrophy F-box* ou atrogin-1

MAP4K3 - Mitogeno proteína quinase ativada quinase quinase quinase 3

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

mTOR – Alvo da rapamicina em mamíferos

MuRF- 1 - *Muscle RING-finger protein-1*

NF-kB – Fator nuclear Kappa B

p70^{S6K} – Proteína quinase S6 ribossômica 70- KDa

p85 - Subunidade regulatória da PI3K

PAB – Proteína ligante de poli A

PAS – Estrutura pré-autofagossomal

PDK1 – Proteína quinase 1 dependente de fosfoinositol

PDK2 - Proteína quinase 2 dependente de fosfoinositol

PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase

PIP3 – Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PKA – Proteína quinase A

PKB – Proteína quinase B, também conhecida como Akt

PKC – Proteína quinase C

REDD – Proteína reguladora da resposta no desenvolvimento do dano ao DNA

RET – Tecido adiposo branco retroperitoneal

RHEB - Homólogo da Ras enriquecido no cérebro.

rpS6 – Proteína ribossomal S6

SUP – Sistema ubiquitina-proteassoma

TAM – Tecido adiposo marrom

TnC – Troponina C

TNF_{BP}- Proteína ligante de TNF- α

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

TnI – Troponina I

TnT- Troponina T

tRNA – Ácido ribonucleico transportador

tRNA_i – Ácido ribonucleico transportador iniciador

TSC1 – Proteína da esclerose tuberosa 1

TSC2 - Proteína da esclerose tuberosa 2

Ub- Ubiquitina

Vsp34 - Subunidade catalítica da PI3K classe III

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do músculo esquelético estriado.....	13
Figura 2: Moléculas de actina (A) e miosina (B).....	15
Figura 3: Iniciação da tradução do mRNA em eucariotos.....	19
Figura 4: Regulação da síntese de proteínas pela insulina, agonistas β_2 - adrenérgicos (β_2 -AR) e aminoácidos.....	22
Figura 5: Principais vias de entrega de substratos para os lisossomos.....	28
Figura 6: Poliubiquitinação e degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina- proteassoma.....	29
Figura 7: Degradação inicial dos componentes das miofibrilas pelas calpaínas.....	31
Figura 8: Degradação inicial dos componentes das miofibrilas pela caspase-3....	32

RESUMO

Estudos prévios mostram que ratos em crescimento alimentados com uma dieta hipoproteica-hiperglicídica (LPHC) por 15 dias, apresentam menor massa do músculo extensor longo dos dedos (EDL) em comparação com ratos alimentados com dieta controle (C). A manutenção da massa dos músculos esqueléticos é resultado do balanço entre dois processos: a síntese de proteínas musculares e a sua degradação pelas diferentes vias proteolíticas. O objetivo deste trabalho foi investigar possíveis alterações nos componentes dessas vias que poderiam explicar a menor massa do músculo EDL dos animais LPHC. Ratos machos Wistar (~100g), foram tratados com dieta C (17% de proteína; 63% de carboidratos) ou LPHC (6% de proteína; 74% de carboidratos), durante 15 dias. As dietas são isocalóricas e isolipídicas. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e o músculo EDL coletado. O conteúdo de proteínas totais do músculo EDL foi determinado pelo método de Bradford. A taxa basal de síntese de proteínas, *in vitro*, foi determinada pela incorporação de L-[U-¹⁴C]tirosina em proteínas totais e utilizando a atividade específica do pool de tirosina intracelular de cada músculo. A proteólise basal total foi determinada, *in vitro*, pela liberação de tirosina no meio de incubação. Foram avaliadas as atividades da caspase-3, da cathepsina B, das calpaínas e a atividade quimiotripsina-like do homogenado por método fluorimétrico. Os conteúdos de atrogina-1, de cathepsina B, de AMPK e p-AMPK, de CREB e p-CREB, de Foxo1 e p-Foxo1, dos componentes autofágicos (LC3 e GABARAP), dos conjugados de ubiquitina de baixo e alto peso molecular, das proteínas da via de sinalização da insulina (IR β , Akt e pAkt) e dos fatores reguladores da síntese proteica (p70^{S6K} e p-p70^{S6K}, 4E-BP1 e p-4E-BP1, e GSK-3 β e p-GSK-3 β) foram determinados por *western blot*. Os dados foram analisados utilizando o teste t-Student e expressos como média $\pm$ erro padrão. Como critério de significância foi adotado $p < 0,05$. A massa e o conteúdo de proteínas totais do músculo EDL dos ratos LPHC foram 36% e 34%, respectivamente, menores em comparação com os ratos C. Houve uma redução na taxa basal de síntese de proteínas (37%) e na proteólise basal total (22%) do músculo EDL dos ratos LPHC em relação aos ratos C. Não houve diferença significativa na atividade das calpaínas de ambos os grupos. A atividade da caspase-3 dos animais LPHC foi 16% menor em relação aos animais C. A avaliação dos componentes do sistema lisossomal mostrou que os ratos LPHC tiveram um aumento de 52% no conteúdo de cathepsina B, porém nenhuma diferença significativa foi observada em sua atividade. O conteúdo dos componentes do sistema autofágico LC3 e GABARAP não diferiu entre os grupos. A avaliação do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma mostrou que o conteúdo de atrogina-1 e a atividade quimiotripsina-like foram 34% e 19% menores, respectivamente, nos ratos LPHC quando comparado aos controles. Nenhuma diferença significativa foi observada no conteúdo dos componentes de ubiquitina de baixo e alto peso molecular. O estímulo com insulina aumentou em 125% e 230% o conteúdo de p-Akt dos animais C e LPHC, respectivamente, quando comparado aos seus valores basais. A dieta LPHC induziu uma redução nos conteúdos de p-CREB, de p-p70^{S6K} e de p-4EBP1 e um aumento no conteúdo de p-Foxo1, do músculo EDL. Os conteúdos de AMPK e p-AMPK e de GSK-3 β e p-GSK-3 β não diferiram entre os ratos LPHC e C. Nossos resultados mostraram que a menor taxa de síntese de proteínas foi determinante para o menor ganho de massa do músculo EDL dos animais LPHC e foi consequência da baixa disponibilidade de aminoácidos da dieta. A redução na proteólise total do EDL via redução da via ubiquitina-dependente e da atividade da caspase-3, representa uma resposta adaptativa, induzida pela maior sensibilidade a insulina, para poupar proteínas e manter a massa muscular.

Palavras chaves: Dieta hipoproteica-hiperglicídica, extensor longo dos dedos, síntese de proteínas, vias proteolíticas, ratos em crescimento, sensibilidade à insulina.

1. REFERENCIAL TEÓRICO.

1.1 Características gerais do músculo esquelético

O músculo esquelético estriado é o maior tecido constituinte dos vertebrados, perfazendo aproximadamente 40-50% do peso corporal total do adulto, sendo considerado o maior “reservatório” de proteínas corporais e a principal fonte de aminoácidos. É um tecido com importante participação nos processos de locomoção, sustentação, postura, produção de calor e respiração; exibindo, assim, uma das maiores atividades metabólicas do organismo¹. É composto principalmente de água (55%-75%), proteínas (20%) e outras substâncias (sais inorgânicos, minerais, lipídios e carboidratos) que juntas representam 5% da composição deste tecido².

O tecido muscular esquelético é formado por células alongadas e estreitas, que possuem capacidade contrátil, denominadas fibras musculares estriadas³. Cada uma das fibras musculares origina-se a partir da fusão intensa de pequenas células indiferenciadas - chamadas de mioblastos - originando células longas, multinucleadas com núcleos localizados na região periférica, abaixo da membrana plasmática⁴. As fibras musculares são constituídas por sarcolema (membrana plasmática), por sarcoplasma (citoplasma) e por núcleo e organizam-se em feixes - os fascículos. As fibras possuem, ainda, mitocôndrias, retículo sarcoplasmático bem desenvolvido e sarcolema com características únicas- como os túbulos T, que atravessam a célula e permitem um contato mais próximo entre o meio extracelular com o interior da célula². Os músculos esqueléticos são envolvidos por três camadas de tecido conjuntivo: o epimísio (densa membrana externa de tecido conjuntivo que envolve todo o músculo esquelético), o perimísio (septos de tecido conjuntivo muito fino que reveste os feixes musculares e por onde os vasos sanguíneos entram nos músculos) e o endomísio (camada delgada de fibras reticulares que reveste cada fibra muscular)⁵. Além do tecido conjuntivo, os músculos esqueléticos são constituídos de vasos sanguíneos e nervos que garantem a sua nutrição e os estímulos essenciais para a execução de suas funções².

O sarcoplasma das fibras musculares possui um citoesqueleto altamente desenvolvido, constituído principalmente de miofibrilas - estruturas cilíndricas - que se estendem por todo o comprimento da fibra. As miofibrilas apresentam um arranjo ordenado, devido à presença de faixas claras e escuras alternadas, e que são responsáveis pelas estriações transversais³. As faixas escuras são denominadas

bandas A (anisotrópicas) e as faixas claras, bandas I (isotrópicas). No centro da banda A, observa-se uma fina faixa mais clara, a banda H, e na região central da banda H, observa-se a linha M. Ao centro da banda I, observa-se uma linha escura, chamada linha Z. A região entre duas linhas Z é denominada de sarcômero, que constituem a unidade contrátil fundamental da fibra muscular⁵ (Figura 1).

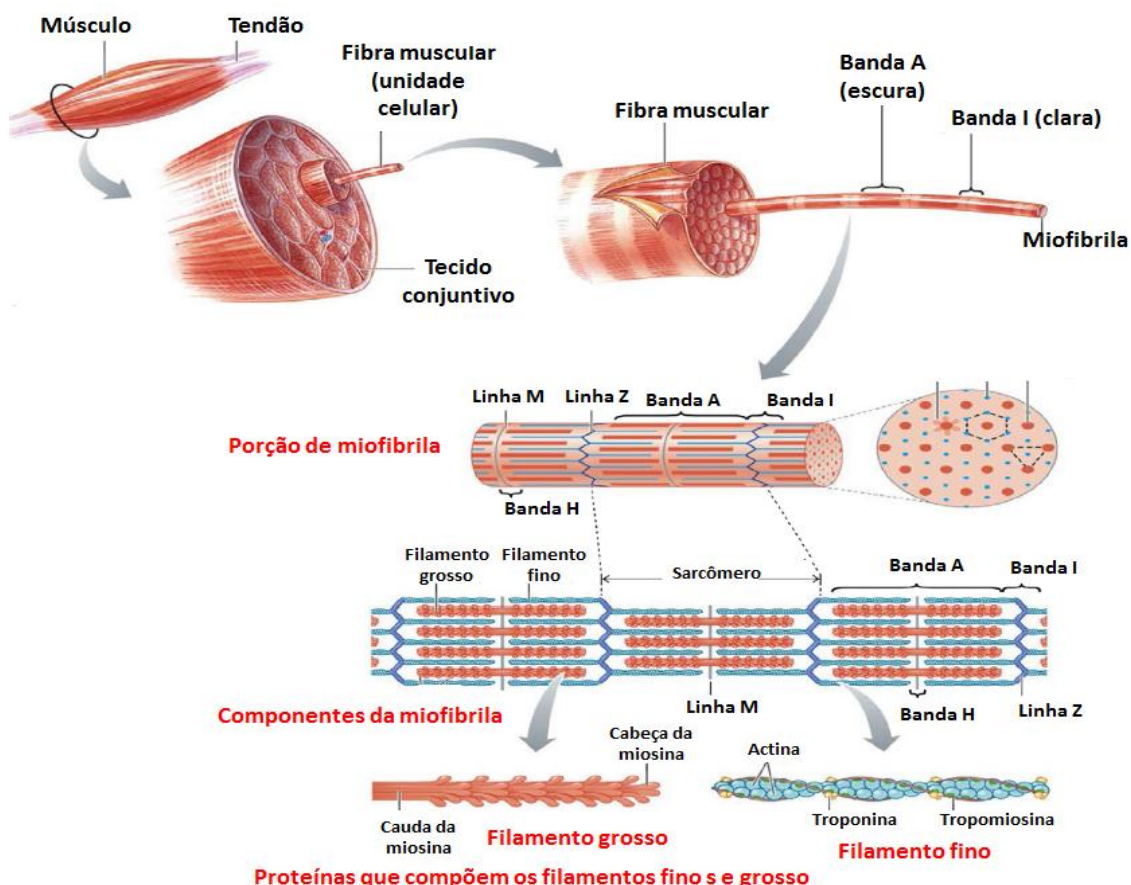


Figura 1: Estrutura do músculo esquelético estriado (adaptada de Fronteira e Ochala, 2014)².

Os sarcômeros são constituídos por miofilamentos contráteis, sendo os principais, a actina (filamento fino) e a miosina (filamento grosso), que compreendem aproximadamente de 70-80% do conteúdo total de proteínas de uma fibra muscular². Além dessas proteínas, os sarcômeros contêm as proteínas regulatórias tropomiosina e troponina que estão associadas aos filamentos de actina e desempenham importante papel no processo de contração muscular e; as proteínas titina e nebulina que contribuem para integridade do sarcômero^{6,7}.

A actina é uma estrutura longa e fibrosa que apresenta uma estrutura helicoidal formada por duas cadeias de monômeros globulares enroladas em dupla hélice (Figura 2A). Seus filamentos estão localizados perpendicularmente em cada lado da linha Z e se estendem até a metade da banda A⁵. A miosina é um filamento grande, complexo e de alto peso molecular, composta de uma extremidade (cabeça globular) que contém locais específicos para combinação com ATP e com a actina e, outra extremidade (cauda) que se liga a outras caudas de várias moléculas de miosina formando os filamentos grossos (Figura 2B). A cabeça da miosina possui atividade ATPásica, hidrolisando o ATP em ADP+Pi e liberando energia para as reações de contração muscular⁵. A tropomiosina caracteriza-se por moléculas longas e finas unidas pelas suas extremidades, formando filamentos longos localizados sobre a actina. Já a troponina é um conjunto de três subunidades (TnT, TnC e TnI), presas a uma molécula de tropomiosina. A TnT, liga-se fortemente à tropomiosina, a TnC possui grande afinidade pelos íons cálcio e a TnI inibe a interação entre a actina e a miosina (Figura 2A).

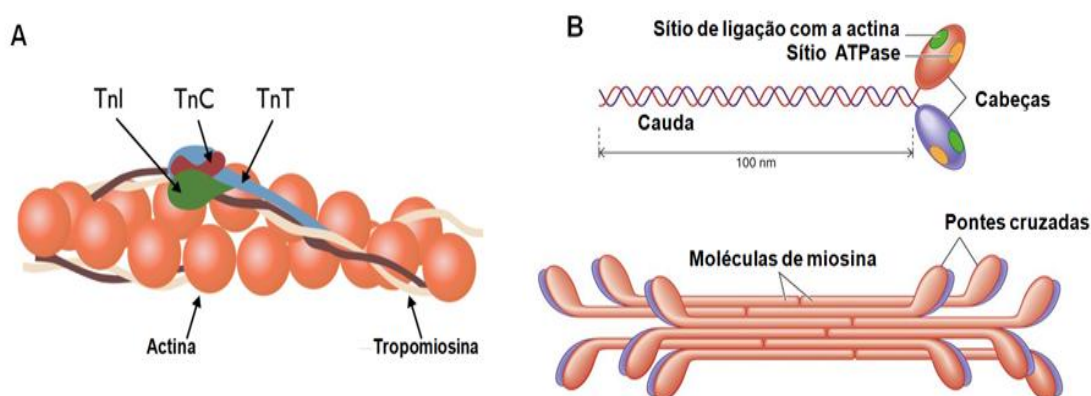


Figura 2: Moléculas de actina (A) e miosina (B). Adaptado do Google (<http://www.my-personaltrainer.it/actina.gif> e <http://www.uvm.edu/~biology/Classes/past-classes/295/Chap8.pdf>).

Embora as características básicas se conservem em todos os tipos de fibras, elas apresentam diferentes propriedades contráteis e metabólicas, sendo, classificadas principalmente em função do tipo de isoforma da cadeia pesada de miosina que predominam em cada tipo de fibra e dos genes específicos que expressam. De forma geral, as fibras musculares podem ser classificadas em quatro tipos: tipo I, tipo IIa, tipo IIb e tipo IIc³. As fibras tipo I possuem grande quantidade de mitocôndrias e mioglobina, alta vascularização, contração lenta e metabolismo oxidativo, o que lhes confere resistência à fadiga. As fibras glicolíticas do tipo IIa

possuem quantidade moderada de mitocôndrias e mioglobina e metabolismo oxidativo e glicolítico, sendo moderadamente resistentes à fadiga. Já as fibras do tipo IIb possuem menor quantidade de mitocôndrias e mioglobina, menor vascularização, contração rápida e metabolismo glicolítico, o que lhes confere menor resistência à fadiga³. As fibras do tipo IId, também denominada IId/IIx, estão presente no músculo de pequenos mamíferos, mas não em humanos, e possui velocidade de contração e propriedades intermediárias entre as tipo IIa e tipo IIb^{9,10}.

O músculo esquelético é um tecido com alta capacidade de adaptação quando exposto a diferentes estímulos, tais como: disponibilidade de oxigênio e nutrientes, níveis hormonais, inervação e inatividade¹. Tais adaptações envolvem mudanças no metabolismo e na expressão de genes que controlam o tamanho e composição das fibras musculares^{11,12}. Algumas doenças, tais como câncer, diabetes, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), situações de imobilização, repouso e jejum podem reduzir a área transversal do músculo esquelético, caracterizando a atrofia muscular^{13,14,15}. Treinamentos de força e de resistência, que requerem maior atividade do músculo esquelético, e os hormônios anabólicos aumentam a área transversal do músculo esquelético caracterizando a hipertrofia muscular¹⁵. Outra adaptação que o músculo esquelético pode sofrer é a conversão gradual das suas fibras. Estímulo como exercícios aeróbicos induz a transformação de fibras do tipo IIb para tipo I; enquanto que o desuso induz a conversão das fibras musculares do tipo I para o tipo IIb¹⁶. Estudos têm mostrado também que frente a diferentes composições de dieta o músculo sofre adaptações na tentativa de manter suas funções primárias¹.

A aquisição, a manutenção ou a perda da massa dos músculos esqueléticos é resultado do balanço entre dois processos: a síntese de proteínas musculares e a sua degradação, sendo ambos os processos finamente regulados. Em situações fisiológicas normais, esses processos estão em equilíbrio dinâmico e a concentração de proteínas intracelulares é mantida constante¹⁷.

1.2 Síntese de proteínas.

A massa do músculo esquelético e o diâmetro de suas fibras variam de acordo com as condições fisiológicas e patológicas¹⁰. O aumento da área transversal do músculo, devido à biossíntese de proteínas miofibrilares, é um processo denominado de hipertrofia muscular¹⁸. Nesse tecido, a síntese de novas proteínas é estimulada pelo aumento na disponibilidade de aminoácidos e por hormônios

anabólicos, como insulina, testosterona, agonistas β_2 -adrenérgicos, hormônio do crescimento, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), dentre outros^{10,19}.

Os ribossomos são os complexos celulares responsáveis pela síntese de proteínas, em um processo denominado de tradução, que envolve a conversão da informação genética contida no ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), sintetizado como cópia complementar de um dos filamentos de DNA, em uma sequência específica de aminoácidos na cadeia polipeptídica. Os ribossomos das células eucarióticas possuem duas subunidades que variam em tamanho entre as espécies: a subunidade menor denominada 40S e a subunidade maior denominada 60S¹⁹.

Durante o processo de tradução, as proteínas são sintetizadas pela ligação de aminoácidos em uma ordem linear específica que é estipulada pela sequência de códons do mRNA. Esse processo, no entanto, exige uma etapa anterior chamada “ativação dos aminoácidos”¹⁹ que é essencial para a adição desses à cadeia polipeptídica. A ativação ocorre no citosol e nesse processo, cada um dos aminoácidos é covalentemente ligado a um RNA transportador (tRNA) específico, às custas de ATP, pela ação de enzimas dependentes de Mg^{2+} conhecidas como aminoacil-tRNA sintetase, formando o aminoacil-tRNA correspondente¹⁹. O tRNA é essencial para a tradução, visto que além de ser específico para cada aminoácido e ser responsável por transportá-los, até o ribossomo, também contém o anticódon (triplete de bases) complementar, que pareia com o códon do mRNA¹⁹.

Basicamente, a síntese proteica nos ribossomos consiste de três estágios: início (ou iniciação), alongamento e término (ou terminação) e são acompanhados por dois estágios adicionais: a ativação dos aminoácidos precursores e o processamento pós-sintético do polímero completo²⁰. Exceto para o processo de ativação de aminoácidos, os demais estágios da síntese proteica requerem energia fornecida pela hidrólise do GTP e fatores proteicos específicos para o processo de síntese do polipeptídeo, muitos dos quais são sensíveis a mudanças hormonais e nutricionais e funcionam de maneira cooperativa^{21,22}.

A iniciação da tradução do mRNA, nos ribossomos, ocorre com a formação de um complexo de iniciação que requer várias proteínas.

Na primeira etapa o iniciador metionil-tRNA (met-tRNA_i) liga-se a subunidade ribossomal 40S como um complexo ternário formado pelo fator de iniciação eucariótico 2 (eIF2), GTP e met-tRNA_i²¹.

Em seguida, o mRNA liga-se também a subunidade ribossomal 40S, em uma reação que é mediada pelo fator de iniciação eucariótico 4F (eIF4F), formando o complexo eIF4F-mRNA. O eIF4F é constituída pelos seguintes fatores: o eIF4E (proteína que liga-se ao quepe 5' do RNAm), o eIF4G (proteína que liga-se ao eIF4E e a proteína ligante de poli (A), denominada PAB), o eIF4A (uma RNA helicase que remove estruturas secundárias do RNAm para permitir a sua ligação a subunidade 40S) e o eIF3 (primeiro fator a se ligar na subunidade 40S facilitando as etapas subsequentes)²¹. A formação do completo eIF4F é regulada, pela associação de um dos seus componentes - o eIF4E com a proteína de ligação 1 do fator de iniciação eucariótico 4 (4E-BP1). Dessa forma, se a 4E-BP1 ligar-se com o eIF4E, a formação do complexo eIF4F-mRNA é bloqueada e por consequência o mRNA não liga-se a subunidade 40S ribossomal. A formação do complexo eIF4E-4EBP1, por sua vez, é regulada pela fosforilação do 4E-BP1, de tal forma que a hiperfosforilação dessa proteína bloqueia a ligação do eIF4E²².

Para a iniciação da tradução ocorrer é necessário também a fosforilação da proteína ribossomal S6 (rpS6), uma vez que ela participa da regulação da ligação do mRNA a subunidade 40S ribossomal, selecionando qual mRNA será traduzido. A fosforilação da rpS6 ocorre em múltiplos sítios e é mediada por uma proteína quinase ribossômica de 70-KDa chamada p70^{S6K}. Essa enzima tem importante papel no aumento da capacidade total da síntese de proteínas, pela célula, visto que ela seleciona preferencialmente, para tradução, mRNA que codificam para as proteínas ribossomais eIF4G, PAB e eIF2^{21,22}.

Logo após o complexo de iniciação ser formado, a subunidade 60S associa-se a esse, preparando-o para a fase de alongamento²². O tRNAi reconhece, então, no mRNA o códon de iniciação para a tradução (AUG)¹⁹ (Figura 3).

O alongamento é a fase onde todas as ligações do peptídeo nascente são formadas e requer proteínas citosólicas conhecidas como fatores de alongamento. Nessa etapa, o mRNA permanece associado ao ribossomo que move-se ao longo do mesmo e traduz sua mensagem em uma sequência de aminoácidos específica²³.

O ribossomo de eucariotos possui os sítios peptidil (P) e o sítio aminoacil (A) que são essenciais para a formação da cadeia polipeptídica. No primeiro ciclo de alongamento, a metionina do tRNAi que ocupa o o sitio P forma uma ligação peptídica com o aminoácido do aminoacil-tRNA que ocupa o sítio A, formando uma ligação peptídica no sítio P (peptidil-tRNA)²³ e o peptidil-tRNA é, em seguida,

transferido para o sítio A. O tRNA no sítio A tem agora a cadeia polipeptídica em crescimento e o tRNA no sítio P não contém aminoácido ou peptídeo²³.

A transferência da cadeia polipeptídica (peptidil-tRNA) que ocupa o sítio A para o tRNA presente no sítio P é catalisada pela enzima peptidiltransferase, que é o próprio rRNA da subunidade 60S. Após a transferência dos aminoácidos para a cadeia polipeptídica em crescimento, o tRNA que ocupa o sítio P é liberado do ribossomo para o citoplasma. O novo peptidil-tRNA formado é deslocado para o sítio P, liberando o sítio A para a ligação do próximo aminoacil-tRNA que adicionará mais um aminoácido à cadeia polipeptídica em formação²⁵. Esse processo continua até que o ribossomo adicione o último aminoácido codificado pelo mRNA. A terminação da síntese da cadeia polipeptídica é sinalizada quando o ribossomo alcança códons específicos no mRNA denominados *stop* códons (UAA, UAG, UGA), imediatamente após o último aminoácido codificado. Neste momento, o novo polipeptídeo é liberado do ribossomo por proteínas denominadas fatores de liberação e o ribossomo é liberado para um novo ciclo de síntese¹⁹.

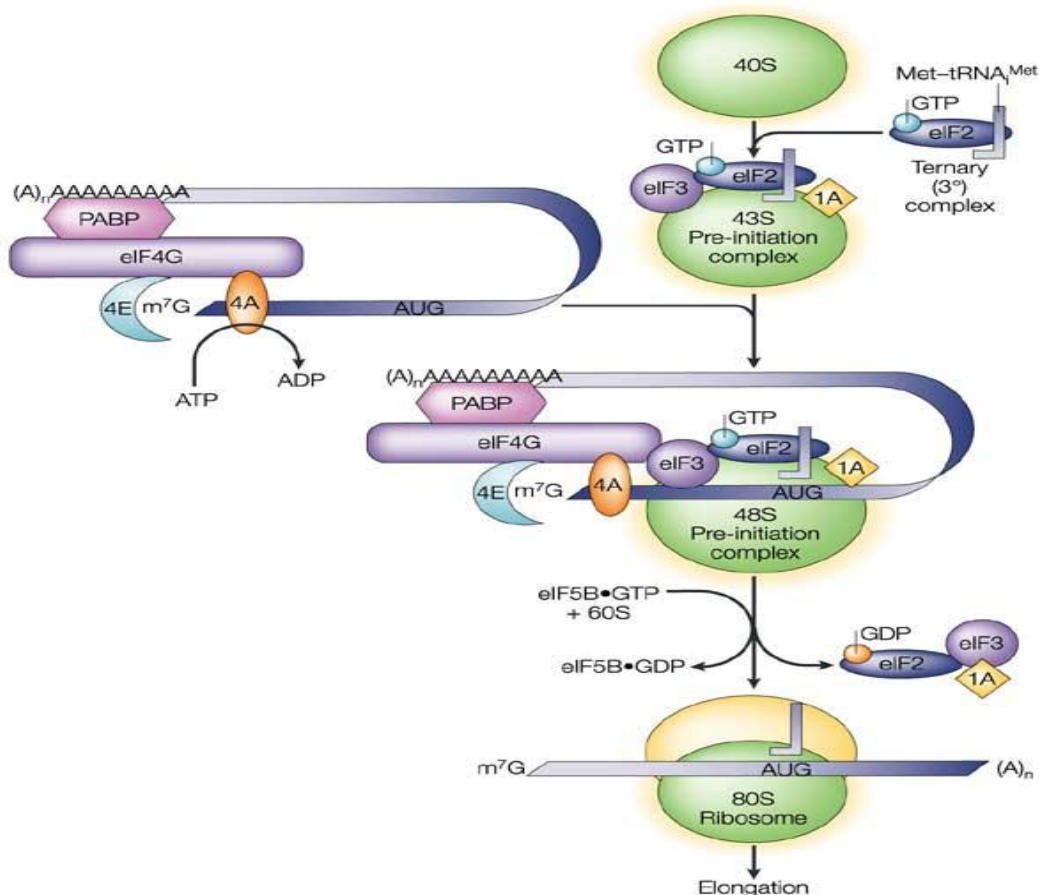


Figura 3: Iniciação da tradução do mRNA em eucariotos (original em Klann e Dever, 2004)²⁴.

A insulina e o IGF-1 são considerados os principais mediadores de desenvolvimento normal dos músculos²⁶. A ativação da síntese de proteínas induzida pela insulina inicia-se, após a sua ligação na subunidade extracelular do seu receptor (IR_{β}), promovendo a sua autofosforilação e a subsequentemente fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS). IRS fosforilado interage com o domínio SH2 da subunidade regulatória (p85) da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) estimulando a sua atividade de fosforilação de fosfatidilinositol 4,5 difosfato de membrana, na posição 3 do anel inositol, levando a geração de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). As proteínas PIP3 recrutam várias proteínas para a membrana plasmática, dentre elas a proteína quinase B (PKB, também conhecida como Akt), formas atípicas da proteína quinase C (PKC) e a proteína quinase-1 e 2 dependente de fosfoinositol (PDK-1 ou PDK-2). PDK-1 ativada tem como substratos a PKC e Akt. A fosforilação de Akt em resíduos específicos de serina e treonina resultam em sua ativação enzimática, permitindo que se separe do complexo formado na membrana plasmática e, então, realize fosforilação de vários substratos dentre eles a alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), promovendo assim ações nas fases de iniciação e alongação da tradução proteica^{21,22,26}. Além desse efeito, a Akt também fosforila e inibe a enzima glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β), impedindo que esta fosforile e iniba o eIF2B, o qual é requerido para a reciclagem do eIF2 (um fator necessário para ligação do metionil-tRNA na subunidade 40S ribossomal)^{27,28} (Figura 4).

A ativação da mTOR conduz a um aumento na síntese de proteínas através da ativação/repressão de várias proteínas. mTOR fosforila inicialmente os resíduos de Thr³⁷ e Thr⁴⁶ da 4E-BP1, um evento que permite a subsequente fosforilação dos resíduos de Ser⁶⁵ e Thr⁷⁰. A fosforilação desses últimos resíduos causa a dissociação do complexo 4E-BP1-eIF4E permitindo que o eIF4E se ligue ao eIF4F e forme o complexo eIF4F ativo²⁹ estimulando a síntese proteica. Outra proteína regulada pela mTOR é a p70^{S6K}; sua hiperfosforilação nos resíduos Thr³⁸⁹ e Thr²²⁹ pela via da PI3K/mTOR, resulta em sua ativação e por consequência leva a hiperfosforilação da rp60 aumentando a capacidade da célula em sintetizar proteínas^{30,31}.

Algumas pesquisas têm estabelecido e reforçado o importante papel que os aminoácidos exercem no controle da tradução proteica do músculo esquelético^{19,21,22}, através da estimulação da mTOR. Dentre os aminoácidos, tem

sido mostrado, através de manipulações de dieta, que a simples alteração na concentração de leucina³² é suficiente para regular a fosforilação e a atividade da sinalização da mTOR, com consequente aumento na fosforilação do 4E-BP1 e p70^{S6K}. Estudos com ratos e humanos também têm reforçado o papel da leucina na regulação da síntese proteica, mostrando que a administração de aminoácidos essenciais (especialmente a leucina) aumentou a síntese de proteínas no músculo esquelético^{33,34,35}. A suplementação de ratos, submetidos à dieta hipoproteica, com leucina³⁶ e lisina³⁷ também mostraram aumento na síntese proteica muscular; a qual foi mediada por indução de proteínas estimuladas pela mTOR; sendo a leucina mais eficiente em estimular a fosforilação de 4E-BP1, rp60 e p70^{S6K}.

Embora os mecanismos pelos quais os aminoácidos estimulem a mTOR não sejam completamente conhecido, estudos tem indicado que eles melhoram a ligação do mRNA na subunidade ribossomal 40S no início da tradução, embora pareçam não afetar a etapa de ligação do met-RNAi. Dois mediadores potenciais são sugeridos estar envolvidos na estimulação da mTOR pelos aminoácidos: a Mitogeno proteína quinase ativada quinase quinase 3 (MAP4K3)³⁸ e a subunidade catalítica da PI3K classe III (Vsp34)³⁹. A ativação dessas duas proteínas pelos aminoácidos resulta em ativação da p70^{S6K}. Outra proteína considerada mediadora na regulação da sinalização da mTOR é uma GTPase da família das Rag. Na ausência de aminoácidos a Rag permanece na conformação inativa e não estimula proteínas envolvidas na estimulação da mTOR⁴⁰.

Diversos trabalhos têm mostrado que a estimulação β -adrenérgica pela adrenalina e a noradrenalina, bem como por outros agonista exercem importante controle no metabolismo de proteínas do músculo esquelético^{41,42,43}. A ação desses agonistas é desencadeada após a interação dessas substâncias com receptores β_2 -adrenérgicos. O receptor β_2 na superfície da membrana muscular está associado à proteína ligadora de nucleotídeos estimulatória (G_s), formada por 3 subunidades (α , β e γ). Na forma não estimulada a subunidade α se encontra ligada ao GDP. A interação dos agonistas com o seu receptor na superfície da membrana plasmática, leva à troca de GDP por GTP na subunidade α , dissociando esta subunidade das demais, formando o dímero $\beta\gamma$. A partir desse ponto, ambas $G\alpha$ -GTP e $G\beta\gamma$ são capazes de ativar diferentes cascatas de sinalização. A subunidade α ligada ao GTP ativa a enzima adenilato ciclase catalisando a conversão de ATP em AMPc (adenosina monofosfato cíclico). Uma das principais ações do AMPc é a ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA), através da ligação desse

nucleotídeo cíclico às subunidades regulatórias (R) da PKA, havendo a liberação das subunidades catalíticas (C), responsáveis pela fosforilação de vários substratos proteicos citoplasmáticos e nucleares, como por exemplo a fosforilação da proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB), induzindo a sua ativação e a translocação do citosol para o núcleo desencadeando a indução da transcrição de genes que regulam o crescimento muscular. Em adição a este efeito, a liberação da subunidade $\beta\gamma$ no músculo esquelético também desempenha um importante papel na hipertrofia muscular uma vez que ela pode ativar vias independentes de AMPc, como por exemplo a PI3K/Akt, que também regulam o crescimento e o desenvolvimento muscular⁴⁴ (Figura 4).

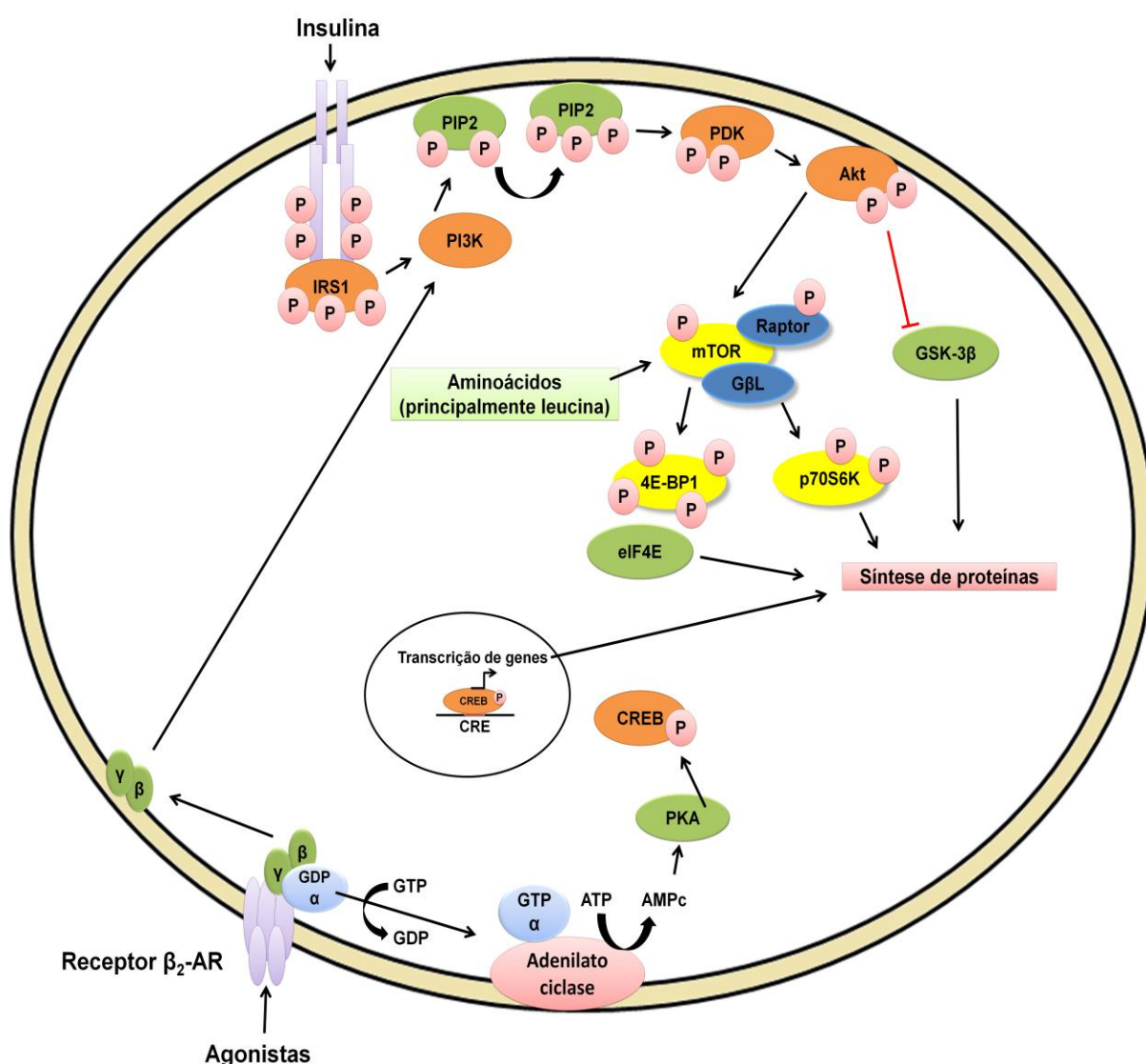


Figura 4: Regulação da síntese de proteínas pela insulina, agonistas β_2 -adrenérgicos (β_2 -AR) e aminoácidos.

Modelos experimentais utilizando atrofia muscular por imobilização ou desnervação em diferentes músculos de ratos, tem mostrado que o tratamento com formoterol e clenbuterol resultou em ganho de massa muscular e aumento na sinalização da mTOR^{45,46,47}. Ratos alimentados com dieta pobre em proteína e tratados com clenbuterol (3,2 mg/kg) por 2 semanas também mostraram aumento no conteúdo proteico e no diâmetro das fibras musculares⁴⁸. Dessa forma, a participação de agonista β -adrenérgicos na estimulação da síntese de proteínas no músculo esquelético tem sido reforçada em diferentes estudos. Seu efeito final, porém, depende do número relativo de receptores β_2 -adrenérgicos em cada músculo e da duração da exposição ao estímulo. Exposição prolongada a agonistas β_2 -adrenérgicos pode levar a desensibilização e diminuição da densidade do receptor, resultando em bloqueio da sua função e inibição da via da Akt-mTOR^{47,49}.

Ao contrário do efeito estimulatório induzido pela insulina, pelo IGF-1, pelos aminoácidos e por agonistas β -adrenérgicos; os glicocorticoides, o TNF- α e a proteína quinase dependente de adenosina monofosfato (AMPK) regulam negativamente a síntese de proteínas⁵⁰.

O efeito inibitório dos glicocorticoides sobre a síntese de proteínas resulta de diferentes mecanismos. Primeiramente, eles podem inibir o transporte de aminoácidos para dentro do músculo⁵¹, limitando com isso a síntese de proteínas. Secundariamente, os glicocorticoides inibem a ação estimulatória da insulina, do IGF-1 e dos aminoácidos (em particular a leucina), sobre a fosforilação do 4E-BP1 e p70^{S6K}, resultando em inibição da fase de iniciação da tradução do mRNA⁵². Estudos indicaram que a repressão da sinalização da via da mTOR em resposta aos glicocorticoides é desencadeada pelo aumento na transcrição da proteína reguladora da resposta no desenvolvimento do dano ao DNA (REDD1 e REDD2), as quais inibem a atividade da mTOR por impedir a fosforilação da Akt⁵³. Tratamento com glicocorticoides também tem sido associado com a repressão do fator ativador de transcrição 4 (ATF-4), que é requerido para ativação de um conjunto de genes que regulam a captação de aminoácidos essenciais e a síntese de aminoácidos não-essenciais e de aminoacil-tRNAs. Esse último efeito deixa evidente que os glicocorticoides inibem a síntese de proteínas, pelo menos em parte, pela limitação na disponibilidade de aminoácidos. Entretanto, um estudo demonstrou que a insulina é capaz de induzir a transcrição de ATF-4, mesmo na presença de glicocorticoides⁵⁴. Além desses efeitos já descritos, os glicocorticoides, ainda, reduzem a síntese de

proteínas musculares a partir da ativação da fosforilação da enzima GSK-3 β com consequente inibição do fator eIF2B⁵⁵.

O efeito do TNF- α inibindo a síntese proteica parece ocorrer em conjunto com a ativação do fator de transcrição NF- κ B⁵⁶. *In vitro*, a adição de TNF- α em cultura de células induz a expressão e ativação de NF- κ B culminando com a supressão da síntese de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas⁵⁷. Estudos em ratos mostram também que uma ação direta dessas citocinas, reduzindo a síntese proteica, ocorre via indução de resistência à insulina uma vez que o TNF- α impede a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1), suprimindo a via insulina/IGF-1/Akt⁵⁸.

Há evidências, ainda, de que altos níveis de TNF- α reduz o número de ribossomos, diminuindo a taxa de síntese de proteínas primariamente a partir da redução da eficiência da tradução⁵⁹. Infusão de TNF- α em ratos provocou alterações na fosforilação de 4E-BP1 e na distribuição de eIF4E⁶⁰. Além disso, o tratamento de ratos sépticos com proteína ligante de TNF- α (TNF_{BP}), que neutraliza o TNF- α endógeno, preveni a redução na fosforilação de 4E-BP1 e a redistribuição de eIF4E a partir do complexo inativo para o complexo eIF4F ativo⁵⁹. Modelos experimentais utilizando situações fisiológicas de superprodução de TNF- α mostraram uma redução na fosforilação dos fatores de iniciação eIF4G o que também contribui para reduzida formação do complexo ativo eIF4F e diminuição na fosforilação da proteína rp60⁵⁹.

Alguns autores têm indicado que em determinadas situações, o TNF- α e os glicocorticoides interagem de maneira cooperativa para suprimir a regulação da síntese de proteínas por nutrientes no músculo. O tratamento de ratos sépticos (com elevados níveis de TNF- α e glicocorticoides) com TNF_{RB} e RU-486 (um inibidor da ação dos glicocorticoides) aumenta a fosforilação de 4E-BP1 e rpS6 estimulada pela leucina, sendo essa resposta similar aquela observada para os ratos controles⁶¹.

Em adição a disponibilidade de aminoácidos e a sinalização de hormônios anabólicos, a síntese de proteínas é regulada pelo nível de energia celular presente nas células musculares e de outros tecidos. Pesquisas têm sugerido que a mTOR funciona como um sensor do nível enérgico da célula por meio da sua regulação pela via da AMPK⁶². AMPK é ativada quando aumenta a razão ADP/ATP, devido à inibição da síntese ou aumento no consumo de ATP. Uma vez ativada, a AMPK age estimulando vias que geram ATP e suprimindo aquelas que consomem esse combustível na musculatura esquelética⁵⁰. A leptina, um hormônio secretado pelos

adipócitos e com efeito primário sob o sistema nervoso central, exerce efeito inibitório sob a síntese de proteínas por meio da estimulação da AMPK⁴⁹.

Inoki *et al.*⁶² identificou que sob condições de baixa energia na célula a AMPK, após ser ativada, fosforila a TSC2 (proteína da esclerose tuberosa 2) nos resíduos de Thr¹²²⁷ e Ser¹³⁴⁵ e aumenta sua função inibitória sobre a mTOR. TSC2 é um componente do complexo TSC1/TSC2 que age como proteína ativadora de GTPase (GAP) para a Homólogo da Ras enriquecido no cérebro (RHEB), estimulando a troca de GTP por GDP. RHEB quando ligado a GTP ativa a mTOR⁶². Adicionalmente, estudos demonstraram que a fosforilação de TSC2 nos resíduos de Ser¹³⁸⁷ prepara a TSC2 para fosforilações adicionais pela GSK-3 β em múltiplos sítios⁵⁰. Gwinn *et al.*, reportou que AMPK pode fosforilar diretamente o complexo mTOR-Raptor (Ser722/792), inibindo a atividade da mTOR em situações de baixa energia⁶³. Porém, independente do mecanismo pelo qual a AMPK inibe a sinalização da mTOR, de maneira geral, tem sido observado que seus efeitos inibitórios são percebidos tanto na fase de iniciação quanto na fase de elongação da tradução de proteínas⁶⁴.

1.3 Degradação de proteínas

Todas as proteínas celulares apresentam uma meia vida, isto significa que as proteínas são hidrolisadas liberando seus aminoácidos constituintes e são repostas pela síntese de novas proteínas. Proteínas individuais no núcleo e citosol, bem como no retículo endoplasmático e mitocôndrias são degradadas com taxas que variam em minutos (para algumas enzimas regulatórias), dias ou semanas (proteínas como as miosinas e actinas musculares) e até meses (hemoglobinas nas células vermelhas)⁶⁵, após a sua síntese. Embora a contínua degradação de proteínas celulares pareça ser um processo de gasto de energia desnecessário, ela exerce funções importantes para a manutenção da homeostase celular, tais como, remoção de proteínas regulatórias do metabolismo/crescimento celular e degradação de proteínas em situações de inadequada ingestão calórica, disponibilizando aminoácidos para a neoglicogênese e para geração de energia^{65,66}.

Em mamíferos os principais processos proteolíticos envolvidos na degradação de proteínas da musculatura esquelética são: o lisossomal, o dependente de Ca²⁺, o ubiquitina-proteassoma e o mediado por caspase-3 ou residual. Entretanto, a velocidade de degradação de proteínas miofibrilares varia em função da situação fisiológica do organismo. Assim, determinadas situações exigem a participação

concomitante de mais de um sistema proteolítico na degradação de proteínas^{65,67}, para que a homeostase do organismo seja mantida.

1.3.1. Sistema proteolítico lisossomal

Os lisossomos, um dos componentes do sistema proteolítico lisossomal, são considerados os maiores componentes da maquinaria degradativa em células de mamíferos. São definidos como vesículas delimitadas por membrana, contendo em seu interior várias hidrolases ácidas (proteases, glicosidades, lipases, nucleases e fosfatases), que estão presentes em seu lúmen ácido (pH 4-5)⁶⁸. A principal função dos lisossomos é a digestão intracelular, permitindo que as células possam digerir porções danificadas e/ou material proveniente da endocitose, organelas, proteínas de membrana (receptores, canais iônicos, transportadores) e glicoproteínas^{65,66}.

O lúmen dos lisossomos é mantido ácido devido a presença de bombas de prótons-ATP do tipo vacuolar (ATPase de H⁺ tipo V) que acopla a hidrólise de ATP ao gradiente de translocação de íons H⁺ do citoplasma para o lúmen lisossomal⁶⁹. Além de estabelecer o gradiente eletroquímico de prótons, a ATPase de H⁺ do tipo V atua no transporte de substâncias pela membrana lisossomal⁷⁰. Dessa forma, a função digestiva dos lisossomos, que depende de sua acidificação, é um processo dependente de ATP e que requer metabolismo energético celular⁷¹.

O retículo endoplasmático e o complexo de Golgi são os centros celulares estratégicos para síntese e tráfego de enzimas lisossomais. Essas duas organelas estão distribuídos através de todas as miofibrilas de todos os tipos de músculos⁷².

As catepsinas L, B, D e H são consideradas as principais proteases lisossomais e suas atividades determinam a capacidade proteolítica dos lisossomos⁷³. A especificidade da hidrólise varia, no entanto, de uma catepsina para outra. A catepsina B hidrolisa miosina de cadeia pesada, troponina T e em menor proporção troponina I e tropomiosina⁷⁴, enquanto a catepsina L degrada a maioria das proteínas miofibrilares com exceção da troponina C e da tropomiosina⁷⁵ e; a catepsina H degrada principalmente troponina T⁷¹. Já a catepsina D catalisa a degradação da miosina de cadeia pesada, da α -actinina, da tropomiosina, da troponina T e da troponina I, mas não degrada actina e troponina C¹¹⁶. Entretanto, estudos têm apontado que as enzimas lisossomais não são as principais responsáveis pela degradação da maioria das proteínas miofibrilares^{65,76}.

As proteínas intracelulares para serem degradadas pelos lisossomos (autofagia) precisam adentrar nessa organela por um dos seguintes processos: por

macroautofagia, por microautofagia, por crinofagia ou por autofagia mediada por chaperonas^{66,74}, sendo subsequentemente hidrolisados pelo lisossomos (Figura 5).

Durante a macroautofagia porções do citoplasma, contendo algumas ou todas as organelas, são rodeadas por uma estrutura pré-autofagossomal (PAS) gerando uma vesícula de dupla membrana denominada de autofagossomo. O autofagossomo funde-se com os lisossomos tornando-se um autolisossomo; local onde os constituintes sequestrados são degradados^{65,77}. A formação do autofagossomo envolve 2 processos de modificações pós-traducionais de proteínas relacionadas à autofagia (Atg): a conjugação de Atg12 com Atg5, com participação da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) de classe III⁷⁸ e; a conjugação da forma citosólica da cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (LC3-I) com o fosfolípido de membrana (fosfatidiletanolamina) formando a LC3-II, o qual fica associada à membrana e é importante para a formação do autofagossomo⁷⁹. Já o processo de sequestração macroautofágica, envolve também 2 outros componentes multiproteicos: o complexo contendo a proteína quinase Atg1 (cujo homólogo nos mamíferos é Ulk 1) e o complexo PI3K_{III} e Beclina (cujo homólogo em mamíferos é Atg 6)⁷⁴.

Células de mamíferos expressam dois homólogos adicionais de Atg: GABARAP (proteína associada ao receptor do ácido gama-aminobutírico) e GATE-16 (*Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*)⁸⁰. No entanto, a função dessas proteínas ainda não foi bem elucidada mas parece atuar em uma fase mais tardia da formação do autofagossomo⁸¹.

No processo de microautofagia, porções do citoplasma são captadas para dentro dos lisossomos por meio da invaginação direta da membrana lisossomal, com subsequente formação de vesículas no lúmen lisossomal (microautofagossomos) que são rapidamente degradadas⁷⁴. Já na crinofagia, vesículas secretórias maduras se fundem com endossomos ou lisossomos existentes. Na autofagia mediada por chaperonas apenas proteínas citoplasmáticas que apresentam a sequência linear pentapeptídica KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) são degradadas pelos lisossomos. No músculo esquelético essa via autofágica não é significativa; embora em outros tecidos como fígado e coração ela seja importante em situações de privação alimentar⁸². Entretanto, estudos têm demonstrado que o sistema lisossomal no músculo esquelético não degrada proteínas não-miofibrilares por autofagia⁶⁶.

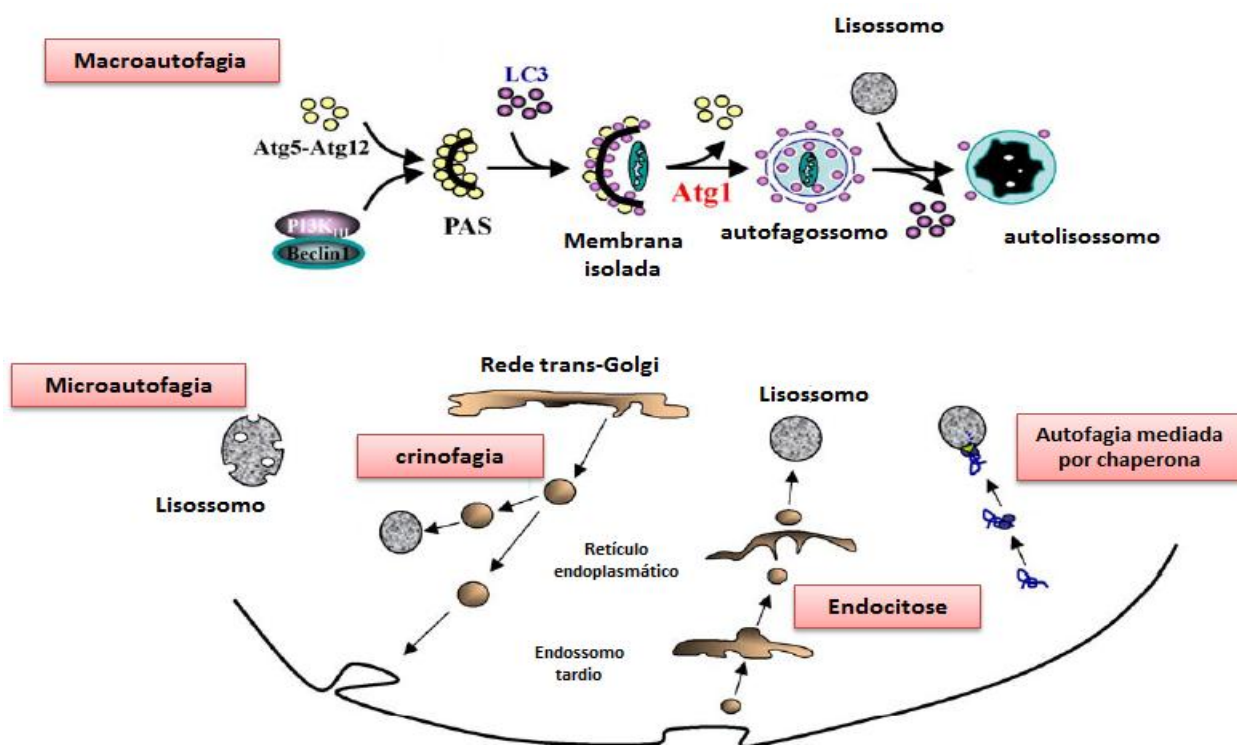


Figura 5: Principais vias de entrega de substratos para os lisossomos (adaptado de Bechet *et al.*, 2005)⁷⁴. PAS= Estrutura pré-autofagossomal; LC3= Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos; Atg= Proteínas relacionadas à autofagia; PI3K= Fosfatidilinositol-3-quinase.

1.3.2. Sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (SUP)

O SUP é o principal responsável pela degradação de proteínas contráteis da musculatura esquelética^{56,65}. Nesse sistema a degradação ocorre a partir da ação combinada de enzimas que ligam co-fatores peptídicos (ubiquitina – Ub) em proteínas, marcando-as, para posterior degradação⁶⁵ pelo proteassoma 26S. A ligação das unidades de Ub à proteína a ser degradada ocorre por meio de um processo denominado poliubiquitinação.

A Ub é uma proteína composta por 76 aminoácidos que se liga covalentemente, por meio de um resíduo de glicina na sua região carboxi-terminal, aos resíduos de lisina das proteínas alvo⁶⁵. O processo de poliubiquitinação envolve a interação cooperativa de 3 classes de enzimas: a enzima ativadora de ubiquitina (E1), a enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e a enzima ligadora de ubiquitina (E3)⁵⁶. O processo de marcação com Ub inicia-se com a sua ativação. O resíduo C-terminal da Ub é ligado covalentemente a um resíduo de sulfidril-cisteína da enzima E1. Isso ocorre com o consumo de 1 ATP. Uma vez ativada a Ub é transferida para a enzima E2, liberando a enzima E1. Finalmente, a enzima E3 reconhece e se liga à

proteína-alvo formando um complexo não covalente, completando assim o processo de marcação do substrato. Para ocorrer poliubiquitinação, as etapas se repetem várias vezes, formando uma ou mais cadeias de Ub⁶⁵. Uma vez marcadas, as proteínas sofrem o processo de degradação através da ação do complexo multicatalítico do proteassoma 26S. Esse componente essencial da via é formado por uma estrutura interna, catalítica, denominada proteassoma 20S (que contém múltiplas atividades peptidásicas) e duas subunidades externas regulatórias, denominadas 19S, compostas por múltiplas ATPases envolvidas no desenovelamento e translocação dos substratos proteicos para o interior da subunidade 20S⁸³. Por fim, após serem reconhecidas pelo proteassoma 26S, as proteínas sofrem um processo de degradação originando pequenos peptídeos (Figura 6). Posteriormente, esses peptídeos são degradados, no citoplasma, aos seus aminoácidos ou são utilizados na apresentação de antígeno.

O maior fator de especificidade do SUP é a enzima E3, uma vez que ela é a enzima determinante da taxa do processo de ubiquitinação⁸⁵, afetando, assim, a taxa de degradação pelo proteassoma. No músculo esquelético são encontradas duas isoformas de E3: atrogin-1 ou MAFbx (*muscle atrophy F-box*) e MuRF1 (*muscle RING finger*), as quais são denominadas de atrogenes^{65,85} porque regulam a perda de massa muscular e a expressão de seus genes são aumentadas em situações de fisiológicas que resultam em atrofia muscular^{65,85,86}.

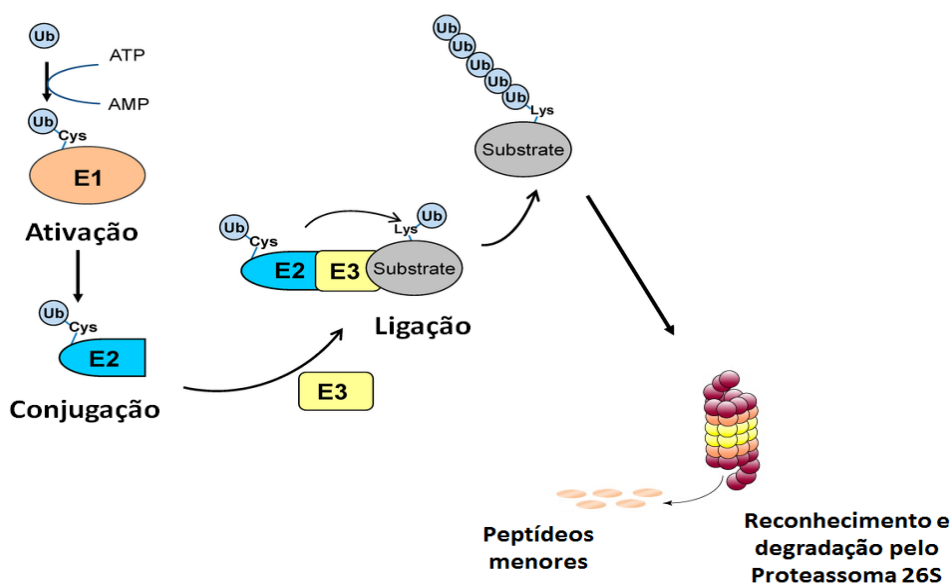


Figura 6: Poliubiquitinação e degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteassoma (adaptado de Chen e Lu, 2015)⁸⁴. E1= Enzima ativadora de ubiquitina; E2= Enzima conjugadora de ubiquitina; E3= Enzima ligadora de ubiquitina.

1.3.3. Sistema proteolítico dependente de Ca^{2+}

O sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} é constituído por cisteíno-proteases, conhecidas como calpaínas, que possuem suas funções reguladas por uma variedade de fatores incluindo cálcio, fosfolipídios e calpastatina (um inibidor específico de calpaínas que promove o controle do processo de degradação de proteínas por meio desta via)^{87,88,89}. As isoformas dessa protease presentes no músculo esquelético são a I, II e III (μ -calpaina, m-calpaina e calpaína 3), diferenciando-se na sensibilidade de ativação pelos íons cálcio^{90,91}. A calpaína I possui atividade catalítica em concentrações micromolares, a calpaína II em concentrações milimolares de cálcio, enquanto a calpaina III é ativada em baixas concentrações de cálcio⁹⁰. Embora apresentem essa diferença, todas as calpaínas têm como substrato proteínas envolvidas na associação e ancoramento das proteínas miofibrilares, tais como: titina, proteínas do disco Z, nebulina, proteína C, troponina T e I, dentre outras^{56,90}. Entretanto, as calpaínas não degradam α -actina, α -actinina e miosina de cadeia pesada⁹².

Muitos estudos apontam que a atividade da via dependente de Ca^{2+} pode ser alterada isoladamente ou em conjunto com outros sistemas proteolíticos em diversas situações catabólicas, provocando mudanças morfológicas no músculo^{56,65}. Baseados nesses estudos têm sido proposto que as calpaínas apresentam um papel significativo na degradação de proteínas miofibrilares, especialmente na dissociação das miofibrilas durante os estágios iniciais de *turnover*. Alguns autores têm mostrado também que essa degradação inicial dos filamentos de actina e miosina da estrutura miofibrilar, pelas calpains, produzem substratos proteicos (monômeros) que serão ubiquitinados e posteriormente degradados pelo sistema ubiquitina-proteassoma^{56,92,93} (Figura 7). Alguns estudos utilizando ratos sépticos mostraram aumento na desintegração da banda Z, na liberação de miofilamentos e nos níveis de mRNA das calpains 1, 2 e 3 no músculo EDL, sugerindo que a proteólise muscular induzida nessas condições é iniciada pela liberação de miofibrilas do sarcômero através da ativação da via dependente de Ca^{2+} ⁹⁴.

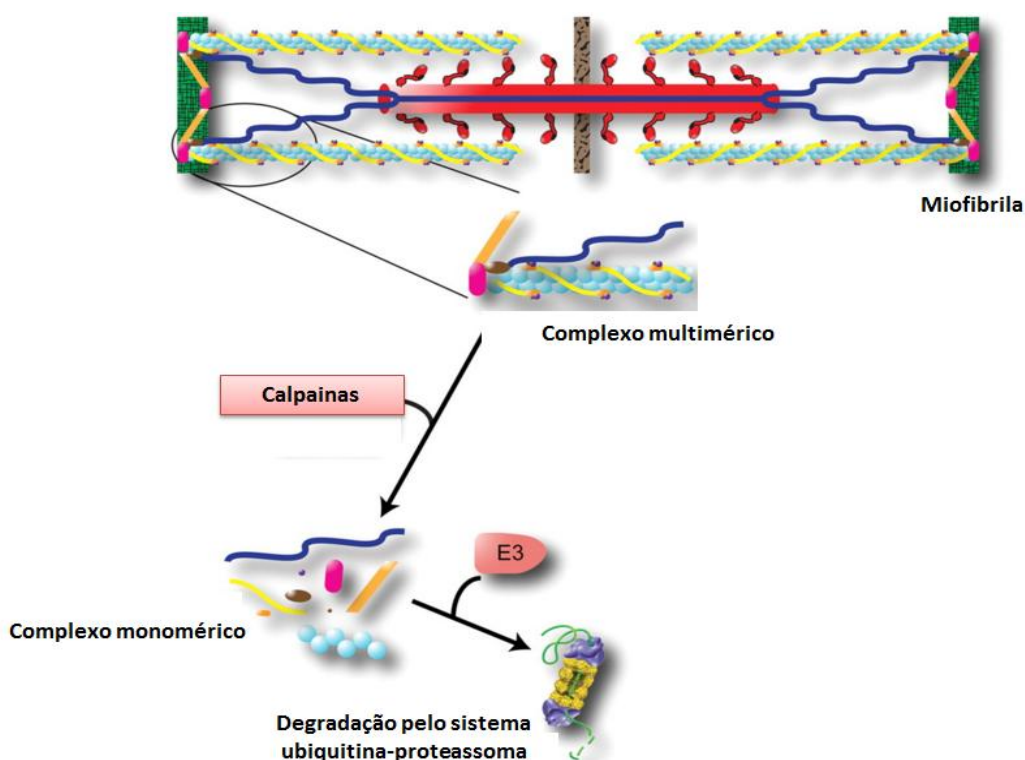


Figura 7: Degradação inicial dos componentes das miofibrilas pelas calpainas (adaptado de Willis *et al.*, 2009)⁹⁵.

1.3.4. Sistema proteolítico residual ou mediado por caspase-3

O fato do SUP não degradar miofibrilas intactas, evidenciou a participação de proteases citosólicas na dissociação inicial dos miofilamentos⁶⁵. A partir de então, estudos tem mostrado a degradação de proteínas mediada por caspase-3 como um passo inicial para a instalação de perda de massa muscular. Esses estudos têm sugerido que a caspase-3 seja responsável por promover a clivagem da actomiosina, em fragmentos de actina de 14 kDa que podem ser ubiquitinados e degradados pelo SUP^{96,97} (Figura 8). Portanto, essa protease parece ter uma relação com a degradação de proteínas musculares evidenciando que não apenas o sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} é responsável por iniciar a degradação das miofibrilas⁹⁶.

A proteólise mediada por caspase-3 pode ser associada a processos de apoptose, os quais são ativados tanto por estímulos externos quanto internos, culminando com a ativação das proteases denominadas caspases⁹⁸. Quando acionadas, estas proteases catalisam a ativação de outros membros de sua família, potencializando a cascata proteolítica. Algumas destas proteases, como a caspase-8, agem como reguladoras e iniciadoras, uma vez que se localizam em regiões

proximais da cascata de sinalização, enquanto outras, como a caspase-3, por ocuparem regiões distais, agem como efetoras da proteólise⁹⁹.

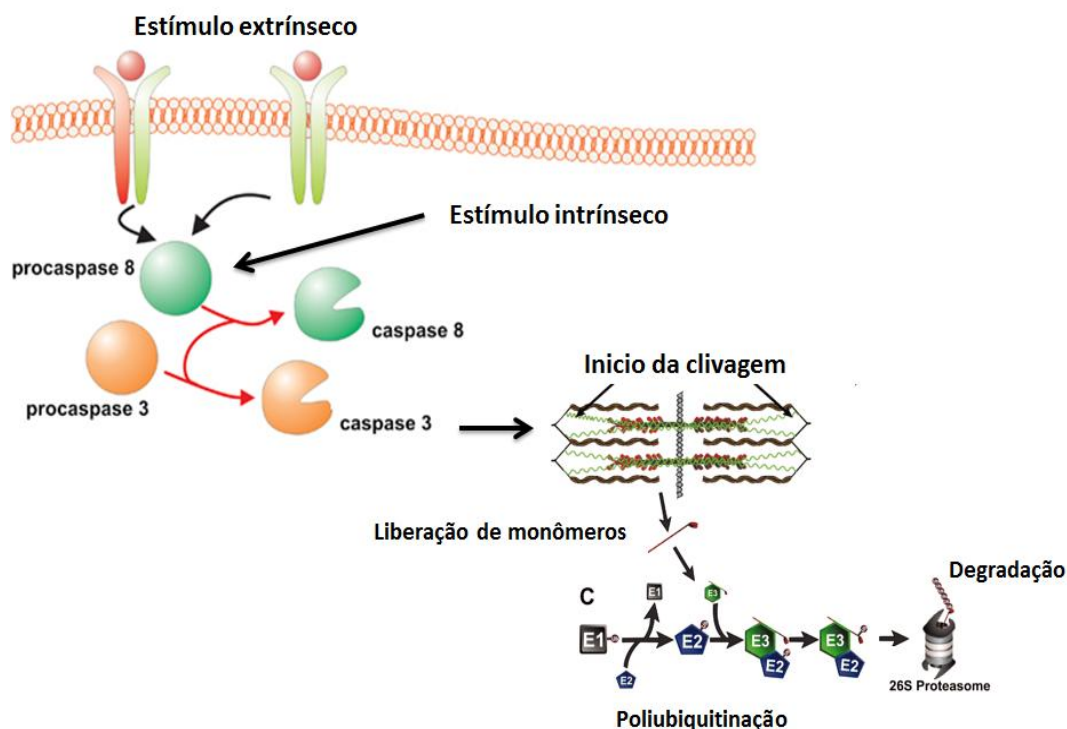


Figura 8: Degradação inicial dos componentes das miofibrilas pela caspase-3 (adaptado de Venero *et al.*, 2011; Jackman e Kandarian, 2004)^{56,100}

1.3.5. Regulação do sistema proteolítico

Os sistemas proteolíticos contribuem de forma diferencial para a degradação de proteínas na musculatura esquelética. As diferentes condições fisiológicas ou nutricionais são importantes para o aumento ou redução na atividade proteolítica muscular, determinando quais vias estarão mais ou menos ativas¹⁰.

Trabalhos têm mostrado modificações na expressão gênica de LC3 e GABARAP em músculo de contração rápida de ratos frente à manipulação de aminoácidos da dieta. Mioblastos da linhagem C2C12 incubados em um meio restrito em aminoácidos não apresentou mudanças na atividade das catepsina B, D e L. Por outro lado, um aumento na proteólise lisossomal tem sido observado em células C2C12 frente a alterações na concentração de aminoácidos do meio⁷⁸. Sugawara *et al.*¹⁰¹, demonstraram que ratos submetidos a restrição proteica suplementados com leucina apresentaram uma diminuição no conteúdo de LC3-II, sugerindo que esse aminoácido parece amenizar a participação da via lisossomal na proteólise muscular nesse modelo experimental. Alteração na expressão de catepsinas também tem sido observada como uma consequência de modificações

nos níveis de hormônios catabólicos (glicocorticoides) e citocinas (TNF- α) circulantes. A perda de massa muscular induzida por glicocorticoides foi associada com aumento nos níveis de mRNA da catepsina B¹⁰². Já um aumento nos níveis de mRNA de catepsina L foi observado em animais com elevada concentração sanguínea de TNF- α ¹⁰³.

A insulina possui um efeito inibitório sobre a proteólise lisossomal, a proteólise residual e o SUP através da ativação da via PI3K/Akt. De forma geral, após ser ativada a Akt fosforila o *Forkhead box* (FoxO), bloqueando sua translocação do citosol para o núcleo. Esse efeito, por sua vez, bloqueia a transcrição de genes relacionados à autofagia (LC3, GABARAP e Atg12)¹⁰ e dos atrogenes (atrogin-1 e MuRF-1)¹⁰⁴. A supressão da atividade da PI3K está associada à ativação da caspase-3, evidenciando o papel da insulina na redução da proteólise residual¹⁰⁵. Gao *et al.*¹⁰⁶ demonstraram que, em cultura de células musculares da linhagem L6 incubadas em meio sem substratos metabólicos, houve produção de fragmentos de actina de 14 kDa gerados pela clivagem de actomiosina pela caspase-3. A geração desses fragmentos, no entanto, não ocorreu quando a insulina (100 nM) foi adicionado ao meio. Muitos estudos reportam, também que a insulina tem ação inibitória simultânea em diferentes vias proteolíticas^{105,107}. Wang *et al.*¹⁰⁸ mostrou ratos com resistência à insulina apresentaram perda de massa muscular, devido a prejuízos na via de sinalização PI3K/AKT, que culminou em aumento das atividades tanto do SUP quanto do sistema mediado por caspase-3.

Outros estudos têm indicado uma associação entre AMPK e Foxo na proteólise muscular. Ao ser ativada a AMPK fosforila alguns sítios da Foxo e por consequência¹⁰ aumenta a expressão de atrogin-1. A ativação da AMPK também aumenta a expressão de genes relacionados à autofagia, tais como da LC3. Uma indução na expressão de MuRF-1 e atrogin-1 no músculo esquelético também tem sido observado pelo tratamento com glicocorticoides e TNF- α ⁵³.

Além da regulação, pelos níveis intracelulares de cálcio, a proteólise dependente de Ca²⁺ é regulada por agonistas β_2 -adrenérgicos. A fosforilação e ativação da PKA aumenta a atividade da calpastatina, resultando na inibição da ação proteolítica das calpaínas¹⁷.

1.4 Dieta hipoproteica- hiperglicídica

Os primeiros estudos do nosso laboratório sobre o efeito de uma dieta hipoproteica-hiperglicídica (LPHC - 6% de proteína; 74% de carboidratos), em ratos

machos na fase de crescimento, mostraram que esses animais, ao final de 15 dias, apresentam um aumento de 14% na ingestão absoluta e de 25% na ingestão relativa de alimento, em relação aos animais que receberam uma dieta controle (C - 17% de proteína; 63% de carboidrato). Apesar do aumento na ingestão de alimento, constatamos que ao final do período experimental, a ingestão proteica foi cerca de 60% menor nos animais LPHC do que a ingestão dos animais que receberam dieta C. Adicionalmente, dieta LPHC induziu uma redução nos níveis pós-prandiais de quase todos os aminoácidos essenciais (com exceção da histidina e lisina). Já a concentração dos aminoácidos não-essenciais foram mantidas (ácido aspártico, serina e arginina) ou aumentadas (ácido glutâmico, glicina e alanina) no plasma dos ratos LPHC¹¹⁴.

Mesmo com o aumento na ingestão de calorias (já que as dietas são isocalóricas) houve uma redução de 12% no ganho de peso corporal, prejuízo no crescimento (avaliada pelo índice de Lee) e redução nas proteínas séricas totais (hipoproteïnemia) nos animais LPHC, deixando claro, que a reduzida ingestão de proteínas prejudicou o crescimento e o desenvolvimento desses animais¹⁰⁹.

Entre outras alterações, os animais LPHC apresentaram maior gasto energético com maior ganho energético quando comparado aos animais C. O aumento no ganho energético com redução de peso corporal (mencionado anteriormente) só foi possível graças a profundas alterações na composição química corporal, com aumento no conteúdo de lipídeos (tecidos adiposos, fígado e carcaça) e redução de proteínas (carcaça, fígado e músculos soleus e EDL) e água¹⁰⁹.

As alterações metabólicas e no balanço energético observadas nos animais LPHC foram acompanhadas por um conjunto de alterações hormonais e neurais; como por exemplo, maior atividade simpática (determinada pelo *turnover* de noradrenalina) no tecido adiposo marrom (TAM) e tecidos adiposos brancos retroperitoneal (RET) e epididimal (EPI) e aumento em cerca de 100% na concentração de leptina e corticosterona sérica e 10X na concentração sérica de TNF- α ^{109,110,111}. A avaliação da glicemia e insulinemia sugeriram um aumento na sensibilidade ao hormônio, uma vez que os animais LPHC, alimentados, apresentaram o mesmo nível de glicemia com menor insulina plasmática; e menor glicemia de jejum sem alteração na insulina, quando comparada aos animais C¹⁰⁹. Corroborando estes resultados, Pereira *et al.*, (2014)¹¹² demonstrou que os animais LPHC apresentaram maior redução nos níveis glicêmicos após a administração de insulina (maior K_{itt}) confirmando a maior sensibilidade a esse hormônio. A avaliação

da sinalização da insulina mostrou diferentes respostas nos tecidos investigados, tais como aumento na sensibilidade no fígado¹¹³, músculo soleus¹¹⁴ e TAM¹¹⁵ e prejuízos na sinalização da insulina no EPI¹¹⁰ e RET¹¹¹ dos ratos LPHC.

A taxa de captação de glicose, avaliada *in vivo* pela incorporação de 2-deoxi-¹⁴C-glicose, mostrou um aumento na captação de glicose pelo músculo soleus (~81%)¹¹² e TAM (3,5 vezes)¹⁰⁹, uma redução na captação do EDL (~43%)¹¹², sem modificações na captação dos EPI e RET¹¹².

Estudos realizados no músculo soleus (oxidativo, composto principalmente por fibras lentas) mostraram uma redução na velocidade de síntese proteica (~19%) e na velocidade de proteólise total (~36%) nos animais LPHC¹¹⁴. A redução da degradação proteica foi associada à redução na atividade de caspase-3 e na participação do sistema ubiquitina-proteassoma. Além disso, o aumento da sensibilidade à insulina foi sugerido como o responsável pela inibição desses processos proteolíticos nesse tecido¹¹⁴.

Estudos têm apontado, no entanto, diferentes respostas dos músculos frente ao mesmo estímulo. Em adição, músculos como EDL (glicolítico, composto principalmente por fibras rápidas) parecem ser mais sensíveis às variações hormonais e nutricionais, especialmente porque apresentam uma função secundária no organismo (movimento) quando comparado à função do soleus (postural). Assim, as modificações impostas pela dieta LPHC sobre a musculatura esquelética merecem ser investigadas em diferentes músculos uma vez que este tecido corresponde a aproximadamente 40% do peso corporal e contém cerca de 50% a 75% das proteínas de todo o organismo¹.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da dieta hipoproteica-hiperglicídica sobre a síntese e degradação de proteínas no músculo EDL de ratos em crescimento, e os mecanismos envolvidos na regulação desses processos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar, *in vitro*, a taxa basal de síntese de proteínas através da determinação da incorporação de [U-¹⁴C]-tirosina em proteínas totais do músculo;
- ✓ Avaliar, *in vitro*, a taxa basal de proteólise total, através da medida de tirosina liberada pelo músculo;
- ✓ Avaliar a participação dos sistemas proteolíticos:
 - Lisossomal: através da determinação dos conteúdos de catepsina B e L e dos componentes do sistema autofágico (LC3 e GABARAP), e através da avaliação da atividade de catepsina B;
 - Dependente de cálcio: através da avaliação da atividade das calpaínas;
 - Ubiquitina-proteassoma: através da determinação dos conteúdos de atrogin-1 e dos conjugados poliubiquitinados de alto e baixo peso molecular e através da avaliação da atividade da quimiotripsina-like (proteassoma 20S) e;
 - Mediado por caspase: através da avaliação da atividade da caspase-3.
- ✓ Determinar o conteúdo das proteínas da via de sinalização da insulina (IR_β, Akt e p-Akt);
- ✓ Determinar o conteúdo total e fosforilado de proteínas envolvidas na regulação da síntese (p70^{S6k}, 4EBP1, GSK-3 β , AMPK, CREB) e degradação de proteínas (Foxo1a).
- ✓ Avaliar o efeito dos glicocorticoides, do TNF- α , da insulina e dos agonistas β_2 -adrenérgicos sobre a síntese de proteínas e a proteólise;
- ✓ Avaliar o efeito da leptina e da baixa disponibilidade de aminoácidos pela dieta LPHC sobre a síntese de proteínas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Matsakas A, Patel K. Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histol Histopathol* 2009;24:611-629.
2. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 2015;96:183-195.
3. Silva MDP, Carvalho RF. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *R Bras Zootec* 2007;36:21-31.
4. Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 2000;23:617-626
5. Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2011.
6. Ottenheijm CAC, Granzier H. Lifting the nebula: novel insights into skeletal muscle contractility. *Physiology* 2010;25:304–310.
7. Monroy JA, Powers KL, Gilomre LA, Uyeno TA, Lindstedt SL, Nishikawa KC. What is the role of titin in active muscle? *Exerc Sports Sci Rev* 2012;40:73–78.
8. nMacIntosh BR, Gardiner PF, McComas AJ. Skeletal Muscle: Form and Function, Human Kinetics, 2ª Ed. 2006.
9. Termin A, Staron RS, Pette D. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* 1989;92:453-457.
10. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* 2013;280:4294-4314.
11. Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem. Cell Biol* 2001;115:359-372.
12. Spangenburg EE, Le Roith D, Ward CW, Bodine SCA. A functional insulin-like growth factor receptor is not necessary for load-induced skeletal muscle hypertrophy. *J Physiol* 2008;586:283-291.
13. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr* 1999;129:227S-237S.
14. Tisdale MJ. The ubiquitin-proteasome pathway as a therapeutic target for muscle wasting. *J Support Oncol* 2005;3:209-217.

15. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 2001;3:1014-1019.
16. Marini M, Veicsteinas A. The exercised skeletal muscle: a review. *European Journal Translational Myology* 2010;20:105-120.
17. Nader GA. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1985-1996.
18. Braun T, Gautel M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12:349-361.
19. Flück M. Regulation of protein synthesis in skeletal muscle. *Dtsch Z Sportmed* 2012;63:75-80.
20. Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*, New York: W. H. Freeman; 2000. 4th edition.
21. Kimball SR, Farrell PA, Jefferson LS. Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *J Appl Physiol* 2002;93:1168-1180.
22. Yoshizawa F. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:417-422.
23. Garrett RH, Grisham CM. Protein synthesis and degradation. In: *Biochemistry*. New York: Saunders College Publishing 1999.
24. Klann E, Dever TE. Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 2004;5:931-942.
25. Marintchev A, Wagner G. Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. *Quarterly Reviews of Biophysics* 2004;37:197-284.
26. Liu Z, Long W, Fryburg DA, Barrett EJ. The regulation of body and skeletal muscle protein metabolism by hormones and amino acids. *J Nutr* 2006;136:212S-217S.
27. Dupont E, Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Stevens L. Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300:R408-R17.
28. Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med*. 2003;9:344-350.

29. Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, and Sonenberg N. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 1999;13:1422–1437.
30. Fumagalli S, Thomas G. S6 phosphorylation and signal transduction. In: *Translational Control of Gene Expression*, edited by Mathews MB. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000, p. 695–717.
31. Dufner A, Thomas G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res* 1999;253:100–109.
32. Vianna D, Teodoro GFR, Torres-Leal FL, Tirapegui J. Protein synthesis regulation by leucine. *Braz J Pharm Sci* 2010;46:29-36.
33. Matthews DE. Observations of branched-chain amino acid administration in humans. *J Nutr* 2005;135:1580S-1584S.
34. Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr* 2005;135:376-382.
35. Donato JJr, Pedrosa RG, Cruzat VF, Pires IS, Tirapegui J. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. *Nutrition* 2006;22:520-Article
36. Gao X, Tian F, Wang X, Zhao J, Wan X, Zhang L, Wu C, Li N, Li J. Leucine supplementation improves acquired growth hormone resistance in rats with protein-energy malnutrition. *PLoS One* 2015;10:e0125023.
37. Sato T, Ito Y, Takashi Nagasawa T. Dietary L-Lysine Suppresses Autophagic Proteolysis and Stimulates Akt/mTOR Signaling in the Skeletal Muscle of Rats Fed a Low-Protein Diet. *J Agric Food Chem* 2015;63:8192–8198.
38. Findlay GM, Yan L, Procter J, Mieulet V, Lamb RF. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling *Biochem J* 2007; 403:13–20.
39. Yuan HX, Russell RC, Guan KL. Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy* 2013;9:1983-1995.
40. Sancak Y, Sabatini DM. Rag Proteins Regulate Amino Acid-Induced mTORC1 Signaling *Biochem Soc Trans* 2009;37:289–290.
41. 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* 2014;117:11-19.
42. Berdeaux R, Stewart R. Intracellular Signal for Skeletal Muscle Adaptation cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 303:E1–E17.
 43. Bruno NE, Kelly AK, Hawkins R, Bramah-Lawani M, Amelio AL, Nwachukwu JC, Nettles KW, Conkright MD. Creb coactivators direct anabolic responses and enhance performance of skeletal muscle. *EMBO J* 2014;33:1027–1043.
 44. Sato S, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Muscle plasticity and β 2-adrenergic receptors: Adaptive responses of β 2-adrenergic receptor Eexpression to muscle hypertrophy and atrophy. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:729598.
 45. Gehrig SM, Koopman R, Naim T, Tjoakarfa C, Lynch GS. Making fast-twitch dys-trophic muscles bigger protects them from contraction injury and attenuates the dystrophic pathology. *Am J Pathol* 2010;176:29–33.
 46. Koopman R, Gehrig SM, Leger B, Trieu J, Walrand S, Murphy KT, Lynch GS. Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic β -adrenoceptor stimulation in mice. *J Physiol* 2010;588:4811–4823.
 47. Ryall JG, Sillence MN, Lynch GS. Systemic administration of β 2-adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses. *Br J Pharmacol* 2006;147:587–595.
 48. Sawaya AL, Lunn PG. Increase in skeletal muscle protein content by the β -2 selective adrenergic agonist clenbuterol exacerbates hypoalbuminemia in rats fed a low-protein diet. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:819-825.
 49. Beitzel F, Gregorevic P, Ryall JG, Plant DR, Sillence MN, Lynch GS. β 2-adrenoceptor agonist fenoterol enhances functional repair of regenerating rat skeletal muscle after injury. *J Appl Physiol* 2004;96:1385–1392.
 50. Miyazaki M, Esser KA. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J Appl Physiol* 2009;106:1367-1373.
 51. Kostyo JL, Redmond AF. Role of protein synthesis in the inhibitory action of adrenal steroid hormones on amino acid transport by muscle. *Endocrinology* 1966;79:531-540.

52. Shah OJ, Kimball SR, Jefferson LS. Acute attenuation of translation initiation and protein synthesis by glucocorticoids in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:E76-E82.
53. Schakman O, Gilson H, Thissen JP. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* 2008; 197:1-10.
54. Adams CM. Role of the transcription factor ATF4 in the anabolic actions of insulin and the anti-anabolic actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* 2007;282:16744-16753.
55. Jefferson LS, Fabian JR, Kimball SR. Glycogen synthase kinase-3 is the predominant insulin-regulated eukaryotic initiation factor 2B kinase in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:191-200.
56. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C834-C843.
57. Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY, and Baldwin AS Jr. NF- κ B-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* 2000;289: 2363–2366.
58. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-668.
59. Lang CH, Frost RA, Vary TC. Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E453-E459.
60. Lang CH, Frost RA. Role of growth hormone, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in the catabolic response to injury and infection. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:271-279.
61. Lang CH, Frost RA. Glucocorticoids and TNF α interact cooperatively to mediate sepsis-induced leucine resistance in skeletal muscle. *Mol Med* 2006;12:291-299.
62. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003;115:577-590.
63. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008;30:214-226.

64. Mounier R, Lantier L, Leclerc J, Sotiropoulos A, Pende M, Daegelen D, Sakamoto K, Foretz M, Viollet B. Important role for AMPK α 1 in limiting skeletal muscle cell hypertrophy. *FASEB Journal* 2009;23: 2264-2273.
65. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1807-1819.
66. Blommaert EF, Luiken JJ, Meijer AJ. Autophagic proteolysis: control and specificity. *Histochem J* 1997;29:365-385.
67. Kuma A, Hatano M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; 432:1032-1036.
68. Kirschke H, Barrett AJ. Chemistry of lysosomal proteases. In: Glaumann H, Ballard FJ. *Lysosomes: Their role in protein breakdown*, New York: Academic, 1987; pp. 193–238.
69. Forgac M. Structure and properties of vacuolar (H⁺)-ATPases. *J Biol Chem* 1999;274:12951–12954.
70. Lloyd JB. Metabolite efflux and influx across the lysosome membrane. *Subcell Biochem* 1996;27:361–386.
71. Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:2098-2114.
72. Ralston E, Lu Z, Ploug T. The organization of the Golgi complex and microtubules in skeletal muscle is fiber type-dependent. *J Neurosci.* 1999;19:10694-10705.
73. Hasilik A. The early and late processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation. *Experientia* 1992;48:130-151.
74. Noda T, Isogai K, Hayashi H, Katunuma N. Susceptibilities of various myofibrillar proteins to cathepsin B and morphological alteration of isolated myofibrils by this enzyme. *J Biochem* 1981;90:371-379.
75. Matsukura U, Okitani A, Nishimuro T, Kato H. Mode of degradation of myofibrillar proteins by an endogenous protease, cathepsin L. *Biochim Biophys Acta* 198;662:41-47.
76. Attaix D, Taillandier. The Critical Role of the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Muscle Wasting in Comparison to Lysosomal and Ca²⁺-Dependent Systems. *Adv Mol Cell Biol* 1998;27:235-266.

77. Kunz JB, Schwarz H, Mayer A. Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J Biol Chem* 2004;279:9987-9996.
78. Tassa A, Roux MP, Attaix D, Bechet DM. Class III phosphoinositide 3-kinase--Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochem J* 2003;376:577-586.
79. Kabeya Y, Mizushima 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* 2000;19:5720-5728.
80. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2503-2518.
81. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal* 2010; 29: 1792-1802.
82. Finn PJ, Plank LD, Clark MA, Connolly AB, Hill GL. Progressive cellular dehydration and proteolysis in critically ill patients. *Lancet* 1996;347:654-656.
83. Hasselgren PO, Fischer JE. The ubiquitin-proteasome pathway: review of a novel intracellular mechanism of muscle protein breakdown during sepsis and other catabolic conditions. *Annals of Surgery* 1997; 225:307-316.
84. Chen Z, Lu W. Roles of ubiquitination and SUMOylation on prostate cancer: mechanisms and clinical implications. *Int J Mol Sci* 2015;16:4560-4580.
85. Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;307:E469-E484.
86. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;98:14440-14445.
87. Suzuki K, Saido TC, Hirai S. Modulation of cellular signals by calpain. *Ann N Y Acad Sci* 1992;674:218-227.
88. Saido TC, Nagao S, Shiramine M, Tsukaguchi M, Yoshizawa T, Sorimachi H, Ito H, Tsuchiya T, Kawashima S, Suzuki K. Distinct kinetics of subunit autolysis in mammalian m-calpain activation. *FEBS Lett* 1994;346:263-267.
89. Ma H, Yang HQ, Takano E, Lee WJ, Hatanaka M, Maki M. Requirement of different subdomains of calpastatin for calpain inhibition and for binding to calmodulin-like domains. *J Biochem* 1993;113:591-599.

90. Murphy RM. Calpains, skeletal muscle function and exercise. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010;37:385-391.
91. Mellgren RL. Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *FASEB J* 1987;1:110-115.
92. Huang J, Forsberg NE. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:12100-12105.
93. Smith IJ, Dodd SL. Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the AKT signaling pathway in rat diaphragm muscle. *Exp Physiol* 2007;92: 561-573.
94. Williams AB, Decourten-Myers GM, Fischer JE, Luo G, Sun X, Hasselgren PO. Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. *FASEB J* 1999;13:1435–1443.
95. Willis MS, Schisler JC, Portbury AL, Patterson C. Build it up-Tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere. *Cardiovasc Res* 2009;81:439-448.
96. Wang XH, Zhang L, Mitch WE, LeDoux JM, Hu J, Du J. Caspase-3 cleaves specific 19 S proteasome subunits in skeletal muscle stimulating proteasome activity. *J Biol Chem* 2010;285:21249-21257.
97. Du J, Wang X, Miereles 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* 2004;113:115-123.
98. Parolin MB, Reason IJM. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arquivos de Gastroenterologia* 2001; 38 (2): 138-144.
99. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:725–731.
100. Venero JL, Burguillos MA, Brundin P, Joseph B. The executioners sing a new song: killer caspases activate microglia. *Cell Death Differ* 2011;18:1679-1691.
101. Sugawara T, Ito Y, Nishizawa N, Nagasawa T. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. *Amino Acids* 2009; 37: 609-616.
102. Bosutti A, Toigo G, Ciocchi B, Situlin R, Guarnieri G, Biolo G. Regulation of muscle cathepsin B proteolytic activity in protein-depleted patients with chronic diseases. *Clin Nutr* 2002; 21:373–378.

103. Deval C, Bechet D, Obled A, Ferrara M. Purification and properties of different isoforms of bovine cathepsin B. *Biochem Cell Biol* 1990;68:822-826.
104. Graça FA, Gonçalves DA, Silveira WA, Lira EC, Chaves VE, Zanon NM, Garófalo MA, Kettelhut IC, Navegantes LC. Epinephrine depletion exacerbates the fasting-induced protein breakdown in fast-twitch skeletal muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E1483-E1494.
105. Lee SW, Dai G, Hu Z, Wang X, Du J, Mitch WE. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1537-1545.
106. 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* 2008;105:1772-1778.
107. Capel F, Prod'Homme M, Béchet D, Taillandier D, Balage M, Attaix D, Combaret L. Lysosomal and proteasome-dependent proteolysis are differentially regulated by insulin and/or amino acids following feeding in young, mature and old rats. *Jf Nutr Biochem* 2009; 20: 570-576.
108. Wang X, Hu Z, Hu J, Du J, Mitch WE. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology* 2006; 147: 4160-4168.
109. Aparecida de França S, Dos Santos MP, Garófalo MA, Navegantes LC, Kettelhut Ido C, Lopes CF, Kawashita NH. Low protein diet changes the energetic balance and sympathetic activity in brown adipose tissue of growing rats. *Nutrition*. 2009;25:1186-1192.
110. Buzelle SL, Santos MP, Baviera AM, Lopes CF, Garófalo MA, Navegantes LC, Kettelhut IC, Chaves VE, Kawashita NH. A low-protein, high-carbohydrate diet increases the adipose lipid content without increasing the glycerol-3-phosphate or fatty acid content in growing rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88:1157-1165.
111. Santos MP, França SA, Santos JT, Buzelle SL, Bertolini GL, Garófalo MA, Kettelhut IC, Frasson D, Chaves VE, Kawashita NH. A low-protein, high-carbohydrate diet increases fatty acid uptake and reduces norepinephrine-induced lipolysis in rat retroperitoneal white adipose tissue. *Lipids*. 2012;47:279-289.
112. Pereira MP, Buzelle SL, Batistela E, Doneda DL, França SA, Santos MP, Andrade CM, Garófalo MA, Kettelhut Ido C, Navegantes LC, Chaves VE, Bertolini

GL, Kawashita NH High glucose uptake in growing rats adapted to a low-protein, high-carbohydrate diet determines low fasting glycemia even with high hepatic gluconeogenesis. *Can J Physiol Pharmacol* 2014;92:460-466.

113. Menezes AL, Pereira MP, Buzelle SL, Dos Santos MP, de França SA, Baviera AM, Andrade CM, Garófalo MA, Kettelhut Ido C, Chaves VE, Kawashita NH. A low-protein, high-carbohydrate diet increases de novo fatty acid synthesis from glycerol and glycerokinase content in the liver of growing rats. *Nutr Res.* 2013;33:494-502

114. Batistela E, Pereira MP, Siqueira JT, Paula-Gomes S, Zanon NM, Oliveira EB, Navegantes LC, Kettelhut IC, Andrade CM, Kawashita NH, Baviera AM. Decreased rate of protein synthesis, caspase-3 activity, and ubiquitin-proteasome proteolysis in soleus muscles from growing rats fed a low-protein, high-carbohydrate diet. *Can J Physiol Pharmacol* 2014;92:445-454.

115. Aparecida de França S, Pavani Dos Santos M, Nunes Queiroz da Costa RV, Froelich M, Buzelle SL, Chaves VE, Giordani MA, Pereira MP, Colodel EM, Marlise Balbinotti Andrade C, Kawashita NH. Low-protein, high-carbohydrate diet increases glucose uptake and fatty acid synthesis in brown adipose tissue of rats. *Nutrition* 2014;30:473-480.

116. Matsumoto T, Okitani A, Kitamura Y, Kato H. Mode of degradation of myofibrillar proteins by rabbit muscle cathepsin D. *Biochim Biophys Acta* 1983;755:76-80.

Artigo em Português.

Maior sensibilidade à insulina no músculo EDL de ratos alimentados com dieta hipoproteica-hiperglicídica inibe a caspase-3 e o sistema ubiquitina-proteassoma, mas não aumenta a síntese de proteínas.

Maísa Pavani dos Santos M.Sc.^a, Emanuele Batistela M.Sc.^a, Mayara Peron Pereira M.Sc.^a, Silvia Paula Gomes Ph.D.^b, Neusa Maria Zanon^b, Isis do Carmo Kettelhut Ph.D.^b, Christina Karatzaferi Ph.D.^c, Claudia Marlise Balbinotti Andrade Ph.D.^a, Suélem Aparecida de França Ph.D.^a, Amanda Martins Baviera Ph.D.^d, Nair Honda Kawashita Ph.D.^a

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

^bDepartamento de Bioquímica e Imunologia, Escola de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

^cFaculdade de Esporte e Ciências da Saúde, Universidade de São Marcos e São João, Plymouth, Reino Unido.

^dDepartamento de Análises Clínicas, Escola de Ciências Farmacêutica, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Tel + 55 65 3615 -8765;

Fax: +55 65 3615-8005.

E-mail: nairhonda@terra.com.br (N. H. Kawashita).

Resumo

O músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos alimentado com uma dieta hipoproteica-hiperglicídica (LPHC) mostrou uma redução de 36% em sua massa quando comparado ao músculo EDL de ratos controles (C). A massa do músculo esquelético é determinada pelo balanço entre a síntese de proteínas e a proteólise; assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os componentes envolvidos nesses dois processos. Foi constatado que, no músculo EDL dos ratos LPHC houve uma redução de 34% na síntese de proteínas basal e uma redução de 22% na proteólise basal, *in vitro*; sugerindo que a redução na massa desse músculo está associada a uma mudança nas taxas desses dois processos. A atividade da caspase-3 e os componentes do sistema ubiquitina-proteassoma (atividade da quimotripsina-like e conteúdo de atrogin-1), avaliados logo após a eutanásia, foram reduzidos no músculo EDL de ratos alimentados com a dieta LPHC. A fosforilação das proteínas p70^{S6K} e 4E-BP1, envolvidas na síntese de proteínas, também foram reduzidas. Após estímulo com insulina, nós observamos um aumento no conteúdo de p-Akt do músculo EDL dos ratos LPHC. Assim, a maior sensibilidade à insulina no músculo desses animais parece ter contribuído para menor proteólise. Entretanto, apesar da maior sensibilidade a insulina, a redução no conteúdo de p-E4-BP1 e p-p70^{S6K} indicou uma redução na síntese de proteínas, mostrando que outros fatores, além da insulina, podem ter um maior efeito sobre o controle da síntese proteica no músculo EDL dos ratos LPHC.

Keywords: Dieta hipoproteica-hiperglicídica; síntese de proteínas; vias proteolíticas; extensor longo dos dedos; sensibilidade à insulina; ratos em crescimento.

1. Introdução

Em países em desenvolvimento, a malnutrição é um evento precoce e comum na vida da sua população. Normalmente, as crianças nesses países consomem uma grande quantidade de carboidratos e uma pequena quantidade de proteínas, o que pode conduzir a danos estruturais e/ou funcionais em alguns órgãos e aumento na mortalidade [1,2].

O músculo esquelético é considerado o tecido mais abundante no corpo, perfazendo aproximadamente de 40-50% da massa corporal total e servindo como o maior reservatório de proteínas do organismo [3,4]. O músculo esquelético exibe uma das mais altas taxas metabólicas de repouso e; é um dos tecidos mais adaptáveis, respondendo a numerosos estímulos externos e fisiológicos [5], os quais podem induzir mudanças no perfil fenotípico, em termos de tamanho e composição [6]. Assim, particularmente em condições de malnutrição, as adaptações dos músculos são fundamentais para a homeostase do organismo.

Alguns autores têm sugerido que a restrição proteica durante estágios críticos do desenvolvimento induz uma redução na massa do músculo esquelético e no tamanho e número de fibras [7, 8], juntamente com maior vulnerabilidade a reações atroficas [9]. Entretanto, outros autores têm mostrado que as fibras musculares, em condições de malnutrição, são capazes de adaptar seu metabolismo, otimizando seu *turnover* de proteínas para preservar suas funções primárias [10-12].

Estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que ratos alimentados com uma dieta hipoproteica-hiperglicídica (LPHC – low protein, high carbohydrate; 6% de proteínas e 74% de carboidratos) por 15 dias, introduzida logo após o desmame, apresentaram aumento na ingestão de dieta e de calorias com redução no ganho de peso corporal, quando comparados com ratos alimentados com uma dieta controle (C; 17% de proteínas e 63% de carboidratos) [13]. Apesar da maior ingestão de dieta, os ratos LPHC ao final de 15 dias de tratamento ingeriram 60% menos proteínas do que os ratos alimentados com a dieta controle; o que foi confirmado pela redução nos níveis pós-prandiais de aminoácidos dos ratos LPHC [13]. O estado de deficiência de proteínas nos ratos LPHC foi ainda comprovado pela hipoproteinemia e prejuízos no crescimento (avaliado pelo índice de Lee), quando comparado com os ratos que receberam dieta C [13]. Além disso, os ratos LPHC apresentaram menor massa corporal com maior ganho energético, como uma consequência do aumento no conteúdo de lipídios corporais e redução nos conteúdos de proteínas e água [13] (os dados são mostrados na Tabela S1 do

material suplementar). Adicionalmente, a dieta LPHC promoveu um aumento nos níveis séricos de epinefrina e norepinefrina, e um aumento de 10x nos níveis do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e de 100% nos níveis de leptina e corticosterona séricos (os dados são apresentados na tabela S2 do material suplementar) [13,15,16]; assim, a dieta LPHC parece ter promovido um ambiente altamente catabólico. Estudo prévio, também mostrou redução na massa de diferentes músculos dos ratos LPHC em relação aos ratos C [13].

A massa e o conteúdo de proteínas do músculo esquelético são determinados pelo equilíbrio dinâmico entre as taxas de síntese de proteínas e a proteólise [6]. Em adição a disponibilidade de aminoácidos, a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) são considerados os principais fatores que controlam o desenvolvimento normal do músculo [17,18]. Esses fatores se ligam aos seus respectivos receptores na membrana plasmática, resultando na ativação/fosforilação da proteína quinase B (PKB), também conhecida como Akt. A Akt estimula a síntese de proteínas através da ativação da alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e de seus efetores abaixo, e através da inibição da glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β), um regulador negativo da síntese de proteínas [19]. A ativação da Akt também induz a fosforilação do fator de transcrição “Forkhead” da família da FoxO (Foxo) e sua subsequente exclusão nuclear, resultando em inibição da transcrição de atrogenes e consequentemente na inibição da proteólise [20].

Por sua vez, há diferentes sistemas proteolíticos nas células. A proteólise intracelular pode ocorrer nos lisossomos após sua fusão com o autofagossomo, o que requer a expressão da cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (LC3) e da proteína associada ao receptor do ácido gama-aminobutírico (GABARAP). A capacidade proteolítica dos lisossomos é determinada pela atividade das catepsinas L, B, D e H [21]. As vias proteolíticas extralissossomais nas células do músculo esquelético de mamíferos incluem as calpaínas ou proteases dependentes de Ca^{2+} , a caspase-3 e o sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma [14]. A especificidade na quebra de proteínas desse último sistema proteolítico depende do conteúdo das enzimas ubiquitina ligases (E3s). Duas E3s, a *muscle F-box protein* (atrogin-1 ou MAFbx) e a *protein muscle RING finger-1* (MuRF-1) são conhecidas como atrogenes e, desempenham um papel decisivo na mediação da perda de massa muscular [20]. Estudos têm indicado a participação das calpaínas e da caspase-3 na dissociação de actina e miosina a partir das miofibrilas, antes dessas serem degradadas pelo proteassoma [22, 23].

Estudo prévio realizado com o músculo soleus dos ratos LPHC mostrou que a redução na massa e no conteúdo de proteínas desse músculo foi uma consequência de uma diminuição na síntese de proteínas e na proteólise total [14]. A redução na proteólise ocorreu principalmente devido a uma inibição do sistema ubiquitina-proteassoma e da atividade da caspase-3 [14]. Os resultados também indicaram uma maior sensibilidade à insulina no músculo soleus dos ratos LPHC, evidenciado pelo aumento no conteúdo do receptor de insulina e na fosforilação da Akt, após estímulo com insulina [14], sugerindo que a maior sensibilidade à insulina no músculo soleus dos ratos LPHC foi responsável pela inibição daqueles processos proteolíticos.

Entretanto, as alterações observadas no metabolismo de proteínas do músculo soleus não são necessariamente válidas para outros músculos esqueléticos, uma vez que as respostas no metabolismo em diferentes situações metabólicas tem se mostrado específicas para cada tipo de músculo. Diferenças na sensibilidade dos músculos esqueléticos a manipulações na dieta têm sido reportadas por alguns autores. Mizushima et al. [24] mostrou que camundongos transgênicos submetidos a privação de nutrientes apresentam uma rápida e intensa macroautofagia no músculo EDL, que contem quase exclusivamente fibras rápidas (glicolíticas, tipo II), e moderada e lenta macroautofagia no músculo soleus, que contem uma alta porcentagem de fibras lentas (oxidativas, tipo I). Além disso, a regulação das vias proteolíticas extralissossomais pode modificar entre músculos esqueléticos que diferem na composição do tipo de fibras [25, 26].

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da dieta LPHC sob os componentes do sistema de síntese e de degradação de proteínas, como o primeiro estágio no estabelecimento dos possíveis mecanismos que expliquem a redução na massa do músculo EDL. Para isso, nós avaliamos no músculo EDL de ratos C e LPHC os seguintes parâmetros: (1) Massa e conteúdo de proteínas do músculo EDL; (2) Taxas basais de síntese de proteínas e proteólise, *in vitro*; (3) Conteúdo de proteínas e atividade de enzimas envolvidas nas vias proteolíticas; (4). Conteúdo de proteínas da sinalização da insulina; (5). Conteúdo basal e fosforilado de 4E-BP1, p70^{S6K}, GSK-3 β , CREB e AMPK, envolvidas na regulação da síntese proteica; e (6) Conteúdo basal e fosforilado de Foxo1, envolvido na regulação da proteólise.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais e tratamento

Os animais utilizados nos experimentos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) e manipulados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da UFMT (protocolo nº 23108.043335/08-1). Ratos machos (5-10 animais por grupo) com peso inicial de aproximadamente 90-100g (~30 dias) foram randomicamente divididos em 2 grupos: (i) grupo controle (C) que foi alimentado com dieta contendo 17% de proteína, 63% de carboidratos e 7% de lipídios e (ii) grupos LPHC que foi alimentado com dieta contendo 6% de proteína, 74% de carboidratos e 7% de lipídios. A redução da proteína da dieta LPHC, em termos de calorias, foi compensada por carboidratos (Tabela 1). As dietas são isocalóricas (16,3 Kj/g) e foram administradas por 15 dias. Os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais à temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ com ciclo claro: escuro de 12 h:12 h; e receberam água e dieta *ad libitum*. O peso corporal e a ingestão de dieta de cada animal foram determinados diariamente. Todos os ratos foram eutanasiados no 15º dia de tratamento, e o músculo EDL coletado, pesado e estocado a -80°C ou imediatamente utilizados nos experimentos. Exceto para a avaliação da sinalização da insulina todos os demais experimentos foram realizados com animais alimentados.

2.2 Conteúdo de proteínas totais do músculo EDL

Ambos os músculos EDL (direito e esquerdo) dos ratos C e LPHC foram utilizados para a análise. Os músculos foram picados e homogeneizados em homogenizador de teflon (Wheaton Overhead Stirrer), em um tampão contendo 50 mM de fosfato de potássio dibásico; 5 mM de EDTA; 0,5 mM de DTT; 1,15% de KCl; 1 mM de PMSF; 5 µg/mL de aprotinina e 1 µg/mL de leupeptina em pH 7,4; na proporção de 4% peso/volume. Os homogenatos foram centrifugados a 600 g por 10 min a 4°C . O conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford [27], e os dados expressos em mg/g músculo.

2.3. Taxas basais de síntese de proteínas e proteólise, *in vitro*.

Dois novos grupos de ratos foram tratados com a dieta C e outros dois grupos com a dieta LPHC. Após 15 de tratamento, os animais no estado alimentado foram eutanasiados, e os músculos EDL removidos e incubados para avaliação da síntese de proteínas, *in vitro*. O mesmo procedimento foi realizado com o outro grupo de ratos C e LPHC para avaliação da proteólise.

Para avaliação da síntese proteica e da proteólise, o músculo EDL foi rapidamente dissecado, pesado e fixado pelo tendão em um suporte apropriado (para manter o músculo na posição de repouso) e incubado em frascos Erlenmeyer (1 músculo/frasco), contendo tampão Krebs-Ringer bicarbonato (0,120 M de NaCl; 0,015 M de NaHCO₃; 4,828 mM de KCl; 1,2 mM de MgSO₄; 1,212 mM de KH₂PO₄; 2,4 mM de CaCl₂; pH 7,4) suplementado com 5 mM de glicose e aerado com 95% de O₂ e 5% de CO₂.

A taxa basal de síntese de proteínas *in vitro*, foi avaliada como previamente descrito [14, 28]. Após 1 h de pré-incubação a 37°C sob agitação constante, os músculos EDL foram incubados, por mais 2 h, no mesmo tampão Krebs-Ringer bicarbonato contendo todos os aminoácidos nas concentrações similares aqueles encontrados no plasma de ratos, durante o período alimentado [29] e L-[U-¹⁴C]tirosina (0,05 µCi/mL). Após o término da incubação, a atividade específica do *pool* de tirosina intracelular de cada músculo foi estimada pela medida da radioatividade no músculo e da atividade específica da tirosina no meio. Após a determinação da radioatividade incorporada em proteínas no músculo, a síntese de proteínas basal, *in vitro*, foi calculada utilizando a atividade específica do *pool* intracelular de tirosina, assumindo que não houve reciclagem do material radiativo durante o período de incubação [14]. A proteólise basal, *in vitro*, foi avaliada como previamente descrito [14, 30], pela determinação de tirosina liberada no meio de incubação. Após 1 h de pré-incubação a 37°C sob agitação constante, os músculos EDL foram incubados, por mais 2 h, no mesmo tampão Krebs-Ringer bicarbonato sem a presença de nenhum aminoácido no meio, mas contendo 0,5 mM de cicloheximida para prevenir a síntese de proteínas e a reincorporação da tirosina liberada. Ao final do período de incubação, 1 mL do meio de incubação foi coletado e a ele adicionados 5 mL de ácido perclórico (1,5 N) e; a tirosina liberada foi determinada utilizando método fluorimétrico como descrito por Waalkes e Udenfriend [31].

2.4. Atividade enzimática

A atividade da caspase-3, das calpaínas, da catepsina B e do proteassoma (atividade quimotripsina-like) foram determinadas fluorimetricamente (PerkinElmer) utilizando os comprimento de ondas de excitação e de emissão de 380 e 460 nm, respectivamente. O conteúdo de proteínas totais dos homogenatos dos músculos foi determinado pelo método de Bradford [27]. A atividade das enzimas proteolíticas foi determinada pela medida do produto fluorogênico liberado (AMC; 7-amino-4-

metilcumarina), utilizando uma curva padrão de AMC (Calbiochem). Os dados foram expressos como nmol de AMC por mg protein por minuto.

Atividade da quimotripsina-like foi avaliada de acordo com Klaude et al. [32]. Os músculos EDL foram homogeneizados em tampão Tris-HCl (pH 7,2) contendo 50 mM de Tris-HCl; 1 mM de EDTA; 100 mM de KCl; 5 mM de $MgCl_2$ e 1,8 mM de ATP. Os homogenatos foram inicialmente centrifugados a 700 g a 4 °C por 10 min, para remoção das células lisadas. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 15.000 g por 10 min. Em seguida, foi adicionado ao sobrenadante glicerol (10% volume/volume) e a mistura utilizada para medir a atividade total da protease. Duplicatas do sobrenadante foram incubadas com o tampão de ensaio (50 mM de Tris-HCl; 1 mM de ATP; 5 mM de $MgCl_2$ e 1 mM de DTT; pH 7,5); e após 1 min de estabilização, 150 μ M do substrato succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Calbiochem, Germany) foram adicionados. Em paralelo, o mesmo procedimento de incubação foi realizado com a adição do inibidor do proteassoma (100 μ M MG132; Sigma Aldrich). Após incubação a 37°C por 45 min, a reação foi interrompida pela adição de 100 mM de tampão acetato de sódio (pH 4,3). A atividade do proteassoma foi determinada pela diferença entre a quantidade de AMC produzido na presença e na ausência de MG 132.

Atividade das calpaínas foi avaliada de acordo com Douillard et al. [33]. Os músculos EDL foram homogeneizados em tampão Tris-HCl (pH 7,4) contendo 20 mM de Tris-HCl; 5 mM de EDTA; 0,1% de Triton X-100 e 1 mM de DTT. Os homogenatos foram centrifugados a 1.000 g a 4 °C por 10 min, para remoção das células lisadas. A atividade das calpaínas foi determinada no sobrenadante utilizando o mesmo substrato mencionado acima na atividade da quimotripsina-like. Duplicatas do sobrenadante foram incubadas com o tampão de ensaio (20 mM de Tris-HCl; 5 mM de $CaCl_2$ e 1 mM de DTT; pH 7,4), e após 5 minutos, o substrato foi adicionado (50 μ M). Em paralelo, o mesmo procedimento de incubação (a 37°C por 30 min) foi realizado com a adição do inibidor de calpaínas (50 μ M de calpastatina; Santa Cruz Biotechnology) a uma mistura de reação que continha 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA e 1 mM DTT; pH 7,4. A reação foi interrompida pela adição de tampão contendo 100 mM de cloroacetato de sódio, 30 mM de acetato de sódio e 70 mM de ácido acético; (pH 4,3). A atividade das calpaínas foi determinada pela diferença entre a quantidade de AMC produzida na ausência e na presença de calpastatina.

Atividade da caspase-3 foi determinada como descrito por Du et al. [22], com pequenas modificações. Os músculos EDL foram homogeneizados em tampão

HEPES (100 mM de HEPES; 10% de sacarose, 0,1% de Triton X-100; e 10 mM de DTT; pH 7,5) e centrifugado a 15.000 g por 45 min. Aliquotas do sobrenadante foram coletadas e adicionadas ao tampão de ensaio (100 mM de HEPES; 10 mM de DTT e 10% de sacarose; pH 7,5) e a mistura foi pré-incubada a 30°C por 30 min. O substrato para caspase-3, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (Calbiochem, Germany), foi adicionado (50 μ M) e a mistura incubada a 30°C por 60 min. A reação foi interrompida pela adição de 100 mM de tampão acetato (pH 4,3). A atividade da caspase-3 foi determinada considerando os dados da curva traçada com o padrão AMC.

Atividade da catepsina B foi determinada como descrito por Barrett e Kirschke [34]. Os músculos EDL foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio (20 mM; pH 6,0) contendo 0,15 M de KCl e 0,1% de Triton X-100 e centrifugados a 15.000 g a 4°C por 10 min. Duplicatas do sobrenadante foram pré-incubadas com o tampão de ensaio (340 mM de acetato de sódio, 60 mM de ácido acético, 4 mM de EDTA e 8 mM de DTT; pH 5,5) a 30°C. Após 1 minuto, 20 μ M do substrato para catepsina-B (Z-Arg-Arg-AMC, 2 HCl; Calbiochem) foram adicionados. A reação foi interrompida, 20 minutos depois, pela adição do mesmo tampão utilizado na avaliação da atividade das calpaínas. A atividade da catepsina B foi determinada considerando os dados obtidos na curva traçada com o padrão AMC.

2.5. Sinalização da insulina.

Ratos C e LPHC foram mantidos em jejum de 5h e, em seguida, receberam intraperitonealmente salina (grupos C e LPHC não estimulados) ou insulina (10 mU/g peso corporal; grupos C e LPHC estimulados). Dez minutos depois da administração de salina ou insulina, os animais foram anestesiados com uma mistura de hidrocloreto de ketamina (Dopalen, Agribrands) e xilazina (Rompun, Bayer®) (2:1), e após perda de mobilidade e de reflexos corneanos, os músculos EDL foram rapidamente removidos. O conteúdo do receptor de insulina (IR β) e Akt e de p-Akt foram determinados por *Western blotting*.

2.6. Análise de proteínas por western blot

Músculos EDL de ratos C e LPHC foram homogeneizados em 50 mM de tampão Tris-HCl pH 7,4, a 4°C, contendo 1% de Triton X-100; 150 mM de NaCl, 10 mM de pirofosfato de sódio; 100 mM de NaF; 1 mM de EDTA, 10 mM de ortovanadato de sódio, 1 mM de PMSF e 5 μ g/mL de aprotinina. A concentração de proteínas totais

dos homogenatos foi determinada pelo método de Bradford [27]. Cem microlitros dos homogenatos, de cada amostra, foram incubados, por 5 min a 100°C, com tampão de Laemmli (0,250 mM de tampão Tris-HCl pH 6,8; 0,5% de azul de bromofenol, 50% de glicerol, 10% de SDS e 500 mM de DTT) na proporção de 4:1, volume/volume. Alíquotas de 100 µg de proteínas foram separadas em gel de 8% a 10% SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocellulose e incubadas com os seguintes anticorpos: anti-catepsina L (1:500; Santa Cruz), anti-catepsina B (1:500; Santa Cruz), anti-conjugados de ubiquitina (1:1000; Santa Cruz), anti-LC3 (1:1000; Santa Cruz), anti-GABARAP (1:1000; Santa Cruz), anti-AMPK (1:1000; Cell Signaling), anti-fosfo-[Thr-172]-AMPK (1:1000; Cell Signaling), anti-IR β (1:750; Santa Cruz), anti-Akt (1:500; Santa Cruz), anti-fosfo-[Ser-473]-Akt1/2/3 (1:500; Santa Cruz), anti-CREB (1:750; Cell Signaling), anti-fosfo-[Ser-33]-CREB (1:750; Cell Signaling), anti-Foxo1 (1:500; Cell Signaling) and anti-fosfo-[Thr-24]-Foxo1 (1:500; Cell Signaling), anti-atrogin-1 (1:1000; c), anti-4E-BP1 (1:500; Cell Signaling), anti-fosfo-[Thr-70]-4E-BP1 (1:500; Cell Signaling), anti-p70^{S6K} (1:500; Cell Signaling), anti-fosfo-[Thr70]-p70^{S6K} (1:500; Cell Signaling), anti-GSK-3 β (1:500; Cell Signaling), anti-fosfo-[Ser-21/9]-GSK-3 (1:500; Cell Signaling) e anti- α -tubulina (1:750; Santa Cruz). Todos os anticorpos utilizados foram recomendados para detecção de proteínas de ratos. As proteínas foram detectadas após incubação *overnight* (4°C) das membranas com os respectivos anticorpos primários, diluídos em TBS-T contendo 5% de albumina. As bandas específicas de cada proteína foram detectadas com um substrato quimioluminescente *Super Signal West Pico*. A intensidade das bandas foram quantificadas com o programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, New York, NY) e normalizadas pela intensidade da banda de α -tubulina (controle interno). Os resultados foram expressos como razão relativa utilizando o controle interno como linha de base.

2.7. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão (EP) e o número de animais indicados entre parênteses. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistica Software (Statsoft, Tulsa, OK, USA). O teste de Bartlett para homogeneidade da variância foi inicialmente usado para verificar se os dados cumpriam o pressuposto da análise da variância. Quando necessário os dados foram log-transformados para correção da heterogeneidade das variâncias ou não-normalidade. Todas as significâncias estatísticas foram analisadas utilizando

teste t de Student. O tamanho da amostra utilizada em todos os experimentos foi calculado considerando um coeficiente de 15% de variação para o efeito biológico [36]. Um valor de $p < 0,05$ foi adotado como critério de significância.

3. Resultados

3.1 Parâmetros fisiológicos e bioquímicos gerais.

Ao final do 15º dia de tratamento, a ingestão total de dieta dos ratos LPHC foi aproximadamente 13% maior em relação aos ratos C. Entretanto, apesar desse aumento na ingestão de dieta, a ingestão total de proteínas e o peso corporal final dos ratos LPHC foram 61% e 23% menores, respectivamente, em comparação com os ratos controles. Esses dados estão de acordo com estudos prévios publicados por nosso laboratório [13-16].

A redução no peso corporal dos ratos LPHC foi acompanhada por uma redução na massa (36%) e no conteúdo de proteínas (34%) do músculo EDL (Tabela 2), quando comparado com os valores obtidos para os ratos controles.

3.2. Síntese de proteínas e proteólise basais, *in vitro*.

A síntese basal de proteínas, *in vitro*, foi marcadamente menor (34%) no músculo EDL dos ratos LPHC quando comparado aos ratos controles (Fig. 1A). Além disso, a dieta LPHC provocou uma redução de 22% na taxa de proteólise basal, *in vitro*, no músculo EDL, em relação aos valores encontrados para os ratos controles (Figura 1B).

3.3. Vias proteolíticas

A avaliação dos componentes do sistema proteolítico lisossomal mostrou que o músculo EDL dos ratos LPHC apresentaram maior conteúdo de catepsina B (52%; Figura 2A), sem mudanças no conteúdo de catepsina L (Figura 2B). Apesar do aumento no conteúdo de catepsina B, a atividade dessa protease foi similar entre os grupos C e LPHC (Figura 2C). Em adição, não houve diferença no conteúdo dos componentes autofágicos, LC3 e GABARAP, no músculo EDL (Figura 2D) dos ratos LPHC em relação aos ratos C.

Proteases relacionadas com a proteólise da estrutura dos sarcômeros também foram avaliadas. A dieta LPHC não afetou a atividade das calpaínas do músculo EDL (Figura 3A). Entretanto, a atividade da caspase-3 foi 16% menor no músculo EDL dos ratos LPHC em relação aos ratos controles (Figura 3B).

Os dados obtidos na avaliação do sistema ubiquitina-proteassoma mostraram que o conteúdo de atrogin-1 foi 34% menor no músculo EDL dos ratos LPHC (Figura 4A). Não houve diferença no conteúdo dos conjugados de ubiquitina de alto e baixo peso molecular (Figura 4B). A atividade da quimotripsina-like (Figura 4C) no músculo EDL foi 19% menor nos ratos LPHC comparados aos ratos controles.

3.4. Sinalização da insulina.

Não houve diferença nos conteúdos de IR_{β} e Akt no músculo EDL dos grupos experimentais. Nos ratos controles, o conteúdo de p-Akt após estímulo com insulina foi aumentado em 125% quando comparado com os valores do grupo C não estimulado. Nos ratos LPHC, esse aumento foi aproximadamente 230% em relação ao grupo LPHC basal (Figura 5C).

3.5 Conteúdo basal e fosforilado de 4E-BP1, $p70^{S6K}$, GSK-3 β , CREB e AMPK (regulação da síntese de proteínas).

A avaliação do conteúdo de proteínas envolvidas no processo de tradução mostrou que o conteúdo de 4E-BP1 foi 50% maior no músculo EDL dos ratos LPHC em relação aos ratos C; entretanto, o conteúdo de p-4E-BP1 foi 42% menor no grupo LPHC (Figura 6A). Similarmente, houve uma redução significativa (70%) nos níveis de fosfo- $p70^{S6K}$ no músculo EDL dos ratos LPHC, embora a dieta não tenha afetado o conteúdo de $p70^{S6K}$ (Figura 6B). Nenhuma diferença foi observada no conteúdo de GSK-3 β e na razão p-GSK-3/GSK-3 do músculo EDL dos ratos LPHC e C (Figura 6C).

Nós investigamos os conteúdos de AMPK e p-AMPK uma vez que essa quinase tem um importante papel na inibição da síntese de proteínas através da supressão da função de múltiplos fatores regulatórios da tradução. Nem o conteúdo de AMPK nem a razão p-AMPK/AMPK foram alterados pelo tratamento com a dieta LPHC por 15 dias (Figura 6D).

A proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (CREB) é um fator de transcrição bem conhecido como alvo da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e é considerado o maior efetor de AMPc no músculo esquelético. Os níveis de CREB foram similares no músculo EDL dos grupos avaliados. Entretanto, a dieta LPHC reduziu os níveis de fosforilação de CREB em 48% (Fig. 6E).

3.6. Conteúdo basal e fosforilado de Foxo1 (regulador da proteólise).

O fator Foxo1 está envolvido na redução da quebra de proteínas do músculo esquelético através da redução da expressão de atrogenes, via AKT. O conteúdo de Foxo1 não foi alterado pela dieta, mas a fosforilação de Foxo1 foi 85% maior no músculo EDL dos ratos LPHC em relação aos ratos C (Figura 7).

4. Discussão

No presente estudo, experimentos *in vivo* e *in vitro* foram realizados, com o objetivo de obter informações sobre o metabolismo de proteínas no músculo EDL de ratos na fase de crescimento, adaptados à dieta LPHC. Nossas investigações mostraram uma redução na massa e no conteúdo de proteínas do músculo EDL dos ratos LPHC quando comparados com os ratos C. Por este motivo, inicialmente nós avaliamos, no músculo EDL, a síntese de proteínas e a proteólise basais *in vitro*, em ratos de ambos os grupos, usando meios de incubação específicos para cada uma das avaliações. Nós observamos que os músculos EDL dos ratos LPHC apresentaram menor incorporação de ^{14}C -tirosina do meio de incubação, assim como, menor liberação de tirosina no meio de incubação; sugerindo menor síntese proteica e proteólise nesses músculos. Entretanto, a redução na incorporação de ^{14}C -tirosina pelo músculo EDL foi maior que a redução na liberação de tirosina pelo músculo incubado. Esses resultados podem explicar a redução na massa do músculo EDL. Batistela et al. [14] realizaram as mesmas determinações, nas mesmas condições, no músculo soleus de ratos LPHC. Comparando nossos dados no músculo EDL, com os dados obtidos no músculo soleus, constatamos que a redução na síntese proteica no soleus foi menor (~19%) que no músculo EDL (~34%), enquanto a inibição da proteólise foi mais pronunciada no músculo soleus (~36%) quando comparado ao EDL (~22%). Esses resultados são consistentes com a maior perda da massa do músculo EDL quando comparado com os músculos soleus dos ratos LPHC: 37% e 27%, respectivamente. A observação de que a massa muscular foi determinada pela mudança na velocidade desses processos parece ser válida em outros músculos e em outras situações. Millward et al. [12] observou que em ratos adultos alimentados com uma dieta contendo 6,8% de proteína, a redução na massa dos músculos esqueléticos gastrocnemius e quadríceps, foi consequência da redução na síntese proteica e na proteólise. Surpreendentemente, os músculos EDL dos ratos LPHC apresentaram maior sensibilidade à insulina, evidenciada pelos maiores níveis de fosforilação de p-Akt quando estimulada pela insulina. Após a insulina se ligar ao seu receptor na

membrana plasmática das células, ela induz a auto fosforilação do receptor e a ativação de uma cascata de sinalização, ativando a via da Akt/mTOR. A mTOR tem um papel crítico na ativação da síntese proteica e na hipertrofia dos músculos esqueléticos [18], uma vez que ela promove aumento na tradução através da ativação de seus alvos “*downstream*”: a proteína quinase S6 ribossômica de 70-KDa (p70^{S6K}) e a proteína de ligação 1 do fator de iniciação eucariótico 4 (4E-BP1), que possuem um papel importante na ativação do estágio de iniciação da tradução, em células eucarióticas. Entretanto, nossos resultados mostraram que, embora a sinalização da insulina estivesse aumentada, os níveis de p-p70^{S6K} e p4E-BP1 no músculo EDL de ratos LPHC se encontram reduzidos; o que explica a menor taxa de síntese proteica, apesar do aumento na fosforilação de Akt. Dessa forma, é claro que, além da insulina, outros fatores podem afetar ou estimular a síntese proteica. Em nosso modelo experimental, a disponibilidade de aminoácido parece ser um fator limitante. Nave et al. [36] mostraram que, em células de mamíferos, a fosforilação de mTOR e a síntese de proteínas, que ocorreram quando estimuladas com insulina, foram bloqueados pela deprivação de aminoácidos; mostrando que a mTOR representa um ponto de integração da sinalização da insulina e de aminoácidos. A administração de aminoácidos essenciais, principalmente a leucina, também induziu um aumento na síntese proteica, através da ativação da via da mTOR [37,38]. Além disso, em situações onde a síntese proteica no músculo esquelético é menor, devido a uma redução do conteúdo de proteína da dieta, é possível reverter à redução na síntese de proteínas, através da suplementação com leucina [39] ou lisina [40]. Previamente nós demonstramos que no período pós-prandial, os níveis plasmáticos de lisina dos ratos LPHC não foram afetados, mas os níveis de leucina foram reduzidos em 30% quando comparado com os valores obtidos para os ratos controles [14] (os dados são apresentados na tabela S3 do material suplementar). Avaliando esses dados conjuntamente, eles sugerem que o reduzido nível de leucina pode representar um fator importante na redução da síntese proteica dos músculos EDL dos ratos LPHC. Experimentos adicionais são necessários para comprovar essa possibilidade.

Quanto às vias proteolíticas, nossos resultados mostraram que o conteúdo de proteínas relacionadas com a autofagia (LC3 e GABARAP) e de catepsina L, bem como a atividade da catepsina B, não sofreram alterações no músculo EDL dos ratos LPHC quando comparado aos ratos C. Esses dados sugerem que o sistema proteolítico lisossomal não está envolvido na redução da massa do músculo EDL

dos ratos LPHC. Entretanto, a inibição da atividade da caspase-3 e do sistema ubiquitina-proteassoma, no músculo EDL de ratos LPHC, pode estar associada à redução na taxa de proteólise basal *in vitro*, desse músculo. A inibição do sistema ubiquitina-proteassoma foi evidenciada pela redução do conteúdo de atrogin-1 e da atividade quimotripsina-like do proteassomo. A expressão de atrogenes, incluindo atrogin-1, é inibida pela sinalização da insulina via PI3K/Akt, que é responsável pela fosforilação do Foxo, que é excluído do núcleo quando fosforilado [41]. Nossos dados mostraram que no músculo EDL de ratos LPHC há um aumento na fosforilação de Foxo1, acompanhado de uma redução no conteúdo de atrogin-1; representando uma diminuição na quantidade de substratos oferecidos ao proteassoma. Esses resultados reforçam os dados obtidos na avaliação *in vitro* da proteólise, onde constatamos uma menor liberação de tirosina no meio e; são corroborados pela maior fosforilação de Akt, após estímulo com a insulina, nos músculos EDL dos ratos LPHC.

O proteassoma é incapaz de degradar miofibrilas intactas [42], assim proteases “*upstream*” a esse sistema são responsáveis pela liberação de proteínas miofibrilares, a partir dos sarcomeros, para subsequente ubiquitinação e degradação pelo proteassoma. As calpaínas [43] e a caspase-3 [22,44] são enzimas envolvidas na dissociação das microfibrilas. De acordo com os nossos dados, a atividade das calpaínas não foi alterada no músculo EDL dos ratos LPHC, mas nós observamos uma redução na atividade da caspase -3. Tem sido reportado, que a insulina é um inibidor da caspase-3 no músculo esquelético. Sob condições de atrofia muscular, tais como diabetes ou uremia crônica, é observado um acúmulo de fragmentos de actina de 14 KDa gerado pela clivagem da actomiosina pela caspase-3 [22]. Quando incubado em um meio sem substratos metabólicos, células musculares L6 mostraram um aumento na clivagem de actina; que foi, entretanto, bloqueada quando a insulina foi adicionada ao meio, através de um mecanismo envolvendo a PI3K [22]. Dessa forma, é possível concluir que a redução da atividade da caspase-3, em associação com a redução do conteúdo de atrogin-1, deve estar relacionada à diminuída disponibilidade de substratos para o sistema ubiquitina-proteassoma, no músculo EDL dos ratos LPHC. Batistela et al. [14] observou mudanças similares nas vias dos sistemas proteolíticos e maior sensibilidade à insulina, com aumento no conteúdo de IR_{β} e na fosforilação de Akt estimulada pela insulina [14] nos músculos soleus de ratos LPHC. Entretanto, em contraste aos nossos achados no músculo EDL, o conteúdo de AMPK e de p-AMPK aumentou no músculo soleus dos ratos

LPHC. Estudos têm mostrado que em alguns músculos esqueléticos, a AMPK aumenta a sensibilidade à insulina e, esse efeito tem um papel importante na inativação da proteólise e outras vias catabólicas [45,46].

Como já tínhamos reportado previamente, os ratos LPHC mostraram aumento nos níveis circulantes de corticosterona, de TNF- α [16] e de leptina [13] (Tabela S2, material suplementar), os quais têm um efeito inibitório sobre a síntese de proteínas. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que esses fatores parecem não ter um efeito significativo na redução da síntese proteica do músculo EDL dos ratos LPHC. A ação inibitória do TNF- α sobre a síntese proteica ocorre, principalmente, via inibição da fosforilação do IRS-1 na Ser307 [47], prevenindo dessa forma, a ação de outras proteínas “*downstream*” da sinalização da insulina, tais como a Akt. Nesse presente estudo, nós não observamos alterações no conteúdo basal de p-Akt, nos músculos EDL dos ratos LPHC, sugerindo que essa citocina não inibiu a sinalização da insulina nesse tecido. O efeito inibitório dos glicocorticoides sobre a síntese proteica ocorre via ativação da GSK-3 β , um alvo “*downstream*” da sinalização da insulina/Akt, suprimindo a síntese proteica pela inibição do fator de transcrição eucariótico 2B (eIF2B) [48]. Já a leptina, diminui a síntese de proteínas através da inibição da fosforilação da mTOR, por meio da ativação da via da AMPK [49,50]. No presente estudo, nós não observamos mudanças no conteúdo GSK-3 β e AMPK ou nos níveis de fosforilação dessas proteínas, nos músculos de ratos LPHC. O conjunto desses resultados sugere que os altos níveis de corticosterona e de leptina, nos ratos LPHC, também não são fatores determinantes para a redução da síntese proteica dos músculos EDL.

Os ratos LPHC exibiram, ainda, maiores níveis de epinefrina e norepinefrina (tabela S2; material suplementar) [15]. Numerosos estudos têm mostrado que a administração de agonistas β_2 regulam positivamente a massa dos músculos esquelético [41,51]. A via de sinalização β_2 -adrenérgica envolve a ativação da proteína $G\alpha_s$, que por sua vez ativa a adenilato ciclase, resultando em aumento na produção de AMPc. A PKA quando ativada pelo AMPc inicia a transcrição de muitos genes através da fosforilação do CREB na Ser133. De fato, a fosforilação do CREB ocorre rapidamente, em músculos esqueléticos, em resposta ao estímulo β_2 -adrenérgico [51]. Além disso, a estimulação β_2 -adrenérgica, no músculo esquelético, leva a liberação da subunidade $G_{\beta\gamma}$ que, por sua vez, ativa a sinalização PI3K/AKT/mTOR induzindo a síntese de proteínas [51]. No presente estudo, nos observamos uma redução de 48% na fosforilação de CREB. Em adição, os níveis

basais de p-Akt não foram alterados, sugerindo que, apesar do aumento nos níveis de catecolaminas plasmáticas, a estimulação β_2 -adrenérgica não está envolvida na redução da síntese de proteínas dos músculos EDL dos ratos LPHC.

Assim, nossos resultados sugerem que apesar do aumento nos níveis de hormônios e de citocinas pró-inflamatórias, que fortemente influenciaram o metabolismo de carboidratos e lipídeos no fígado [52] e nos tecidos adiposos [15,16,53] dos ratos LPHC, como constatado em trabalhos prévios; as alterações no metabolismo de proteínas nos músculos EDL não são influenciadas por esses fatores.

Em resumo, podemos concluir que:

- (i) O aumento na sensibilidade à insulina nos músculos EDL dos ratos LPHC contribui para a redução na proteólise, através da redução da atividade da caspase-3 e do sistema ubiquitina-proteassoma.
- (ii) A menor taxa de síntese proteica nos músculos EDL dos ratos LPHC está provavelmente associada à inibição da fosforilação de mTOR, como uma consequência da menor disponibilidade de aminoácidos específicos; sugerindo que a síntese de proteínas é diretamente afetada pela quantidade e qualidade dos aminoácidos provenientes das proteínas da dieta.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Air Francisco Costa, ao Celso Roberto Afonso e à Cristina Helena Alves por suas assistências técnicas. Esse trabalho foi suportado financeiramente pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT 286326/2010 e FAPEMAT 222560/2015).

Referências

- [1] Patel MS, Srinivasan M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. *Ann Nutr Metab* 2011;58:18–28.
- [2] Steyn NP, Mchiza Z, Hill J, Davids YD, Hinrichsen E, Opperman M, et al. Nutritional contribution of street foods to the diet of people in developing countries: a systematic review. *Public Health Nutr* 2013;17:1–12.
- [3] Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 2015;96:183–95.
- [4] Liu Z, Long W, Fryburg DA, Barrett EJ. The regulation of body and skeletal muscle protein metabolism by hormones and amino acids. *J Nutr* 2006;136:212S–7S.

- [5] Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* 2013;280:4294–314.
- [6] Matsakas A, Patel K. Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histol Histopathol* 2009;24:611–29.
- [7] Prescod AL, Halliday WC, Taylor CG. Protein deficiency, but not zinc deficiency, reduces recovery of type 1 and type 2 muscle fibre diameters in the gastrocnemius muscle of growing rats. *Br J Nutr* 2011;106:675–82.
- [8] Alves AP, Dâmaso AR, Dal PV. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. *J Pediatr* 2008;84:264–71.
- [9] Kim JY. Hindlimb muscle atrophy occurs from short-term undernutrition in rats. *Biol Res Nurs* 2013;15:459–64.
- [10] Tawa Jr NE, Goldberg AL. Suppression of muscle protein turnover and amino acid degradation by dietary protein deficiency. *Am J Physiol* 1992;263:E317–25.
- [11] Da Silva AR, Guzmán-Quevedo O, Pérez-García G, Toscano AE, Gois Leandro C, Manhães-de-Castro R, et al. Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition. *Acta Physiol* 2014;210:70–83.
- [12] Millward DJ, Garlick PJ, Stewart RJ, Nnanyelugo DO, Waterlow JC. Skeletal-muscle growth and protein turnover. *Biochem J* 1975;150:235–43.
- [13] Aparecida de França S, Dos Santos MP, Garófalo MA, Navegantes LC, Kettelhut Ido C, Lopes CF, et al. Low protein diet changes the energetic balance and sympathetic activity in brown adipose tissue of growing rats. *Nutrition* 2009;25:1186–92.
- [14] Batistela E, Pereira MP, Siqueira JT, Paula-Gomes S, Zanon NM, Oliveira EB, et al. Decreased rate of protein synthesis, caspase-3 activity, and ubiquitin-proteasome proteolysis in soleus muscles from growing rats fed a low-protein, highcarbohydrate diet. *Can J Physiol Pharmacol* 2014;92:445–54.
- [15] Buzelle SL, Santos MP, Baviera AM, Lopes CF, Garófalo MA, Navegantes LC, et al. A low-protein, high-carbohydrate diet increases the adipose lipid content without increasing the glycerol-3-phosphate or fatty acid content in growing rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88:1157–65.
- [16] Santos MP, França SA, Santos JT, Buzelle SL, Bertolini GL, Garófalo MA, et al. A low-protein, high-carbohydrate diet increases fatty acid uptake and reduces

norepinephrine-induced lipolysis in rat retroperitoneal white adipose tissue. *Lipids* 2012;47:279–89.

[17] Pasiakos SM, McClung JP. Supplemental dietary leucine and the skeletal muscle anabolic response to essential amino acids. *Nutr Rev* 2011;69:550–7.

[18] Yoshizawa F. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:417–22.

[19] Dupont E, Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Stevens L. Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;300:R408–17.

[20] Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;307:E469–84.

[21] Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:2098–114.

[22] Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* 2004;113:115–23.

[23] Smith IJ, Dodd SL. Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the AKT signaling pathway in rat diaphragm muscle. *Exp Physiol* 2007;92:561–73.

[24] Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004;15:1101–11.

[25] Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Muscle wasting associated with cancer cachexia is linked to an important activation of the ATP dependent ubiquitin-mediated proteolysis. *Int J Cancer* 1995;29(61):138–41.

[26] Graça FA, Gonçalves DA, Silveira WA, Lira EC, Chaves VE, Zanon NM, et al. Epinephrine depletion exacerbates the fasting-induced protein breakdown in fast-twitch skeletal muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E1483–94.

[27] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.

[28] Navegantes LC, Resano NM, Baviera AM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E642–7.

- [29] Scharff R, Wool IG. Effect of diabetes on the concentration aminoacids in plasma and heart muscle of rats. *Biochem J* 1966;99:173–8.
- [30] Pepato MT, Migliorini RH, Goldberg AL, Kettelhut IC. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol* 1996;271:E340–7.
- [31] Waalkes TP, Udenfriend S. A fluorimetric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J Lab Clin Med* 1957;50:733–6.
- [32] Klaude M, Fredriksson K, Ader ITJ, Hammarqvist F, Ahlmans B, Rooyackers O, et al. Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis. *Clin Sci* 2007;112:499–506.
- [33] Douillard A, Galbes O, Begue G, Rossano B, Levin J, Vernus B, et al. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:364–72.
- [34] Barret AJ, Kirschke H. Cathepsin B, cathepsins H and cathepsins L. *Methods Enzymol* 1981;80:535–61.
- [35] Scheibe PO. Number of samples — hypothesis testing. *Nucl Med Biol* 2008;35:3–9.
- [36] Nave BT, Ouwens DM, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino acid deficiency on protein translation. *Biochem J* 1999;344:427–31.
- [37] Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr* 2005;135:376–82.
- [38] Donato Jr J, Pedrosa RG, Cruzat VF, Pires IS, Tirapegui J. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. *Nutrition* 2006;22:520–7.
- [39] Gao X, Tian F, Wang X, Zhao J, Wan X, Zhang L, et al. Leucine supplementation improves acquired growth hormone resistance in rats with protein-energy malnutrition. *PLoS One* 2015;10:e0125023.
- [40] Sato T, Ito Y, Takashi NT. Dietary L-lysine suppresses autophagic proteolysis and stimulates Akt/mTOR signaling in the skeletal muscle of rats fed a low-protein diet. *J Agric Food Chem* 2015;63:8192–8.
- [41] Manfredi LH, Zanon NM, Garófalo MA, Navegantes LC, Kettelhut IC. Effect of shortterm cold exposure on skeletal muscle protein breakdown in rats. *J Appl Physiol* 2013;115:1496–505.

- [42] 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* 1996;271:26690–7.
- [43] Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci* 2008;86:E19–35.
- [44] Lee SW, Dai G, Hu Z, Wang X, Du J, Mitch WE. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1537–45.
- [45] Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 2007;100:328–41.
- [46] Wang P, Zhang RY, Song J, Guan YF, Xu TY, Du H, et al. Loss of AMP-activated protein kinase impairs the insulin-sensitizing effect of calorie restriction in skeletal muscle. *Diabetes* 2012;61:1051–61.
- [47] Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665–8.
- [48] Jefferson LS, Fabian JR, Kimball SR. Glycogen synthase kinase-3 is the predominant insulin-regulated eukaryotic initiation factor 2B kinase in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:191–200.
- [49] Miyazaki M, Esser KA. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J Appl Physiol* 2009;106:1367–73.
- [50] Berdeaux R, Stewart R. Intracellular signal for skeletal muscle adaptation cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303:E1–17.
- [51] Sato S, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Muscle plasticity and β 2-adrenergic receptors: adaptive responses of β 2-adrenergic receptor expression to muscle hypertrophy and atrophy. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:729598.
- [52] Menezes AL, Pereira MP, Buzelle SL, Dos Santos MP, de França SA, Baviera AM, et al. A low-protein, high-carbohydrate diet increases de novo fatty acid synthesis from glycerol and glycerokinase content in the liver of growing rats. *Nutr Res* 2013;33:494–502.
- [53] Aparecida de França S, Pavani Dos Santos M, Nunes Queiroz da Costa RV, Froelich M, Buzelle SL, Chaves VE, et al. Low-protein, high-carbohydrate diet increases glucose uptake and fatty acid synthesis in brown adipose tissue of rats. *Nutrition* 2014;30:473–80.

Tabelas

Tabela 1: Composição (g/kg) das dietas controle e hipoproteica-hiperglicídica.

Ingredientes	Controle	LPHC
Caseína (84% de proteína)	202	71,5
Amido	397	480
Dextrina	130,5	159
Sacarose	100	121
Oleo de soja	70	70
Fibras (celulose)	50	50
Minerais (AIN 93 G)*	35	35
Vitaminas (AIN 93 G)*	10	10
L-cistina	3	1
Bitartarato de colina	2,5	2,5

*Para detalhes da composição, ver Reeves et al. (1993).

Tabela 2: Ingestão total de dieta e proteínas, peso corporal inicial e final, massa e conteúdo de proteínas do músculo EDL de ratos controle (C) e hipoproteico-hiperglicídica (LPHC) após 15 dias de tratamento.

Parâmetros	Controle	LPHC
Peso corporal inicial (g)	93,57±1,14	93,08±1,41
Peso corporal final (g)	191,52±2,95	148,05±6,88*
Ingestão total de dieta (g)	216,69± 6,32	244,96±9,57*
Ingestão total de proteínas (g)	36,83±1,02	14,70±0,61*
Massa do EDL (g)	0,176± 0,012	0,113± 0,005**
Conteúdo de proteínas do EDL (mg/g de músculo)	213,50±8,24	140,98±8,98**

Os dados são apresentados como média± EP de 8-10 ratos.

*P<0.05 vs. ratos controles; **P<0.01 vs. ratos controles (Student t-test).

Figuras

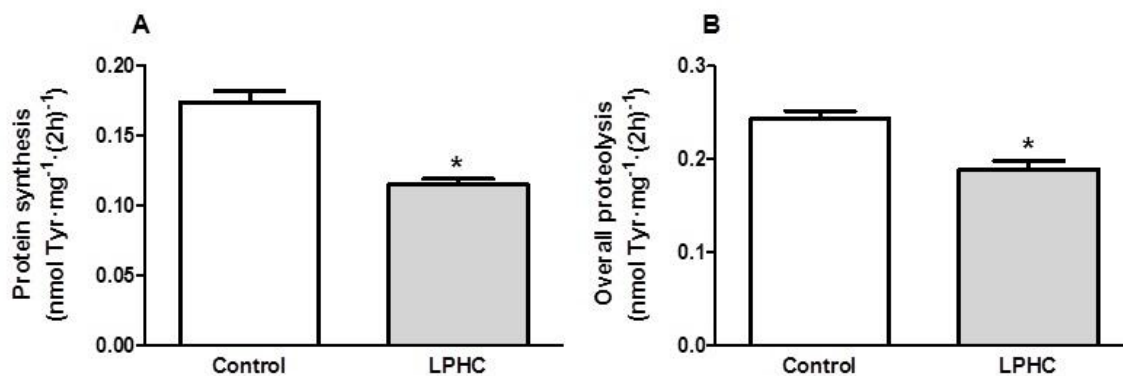


Figura 1: Taxas basais de síntese de proteínas (A) e proteólise (B) *in vitro*, no músculo EDL de ratos controle e hipoproteico-hiperglicídico (LPHC), após 15 dias de tratamento. Os dados são apresentados como média $\pm$ EP (n=6-8 ratos). *P<0.05 *versus* dieta controle (Student's t test).

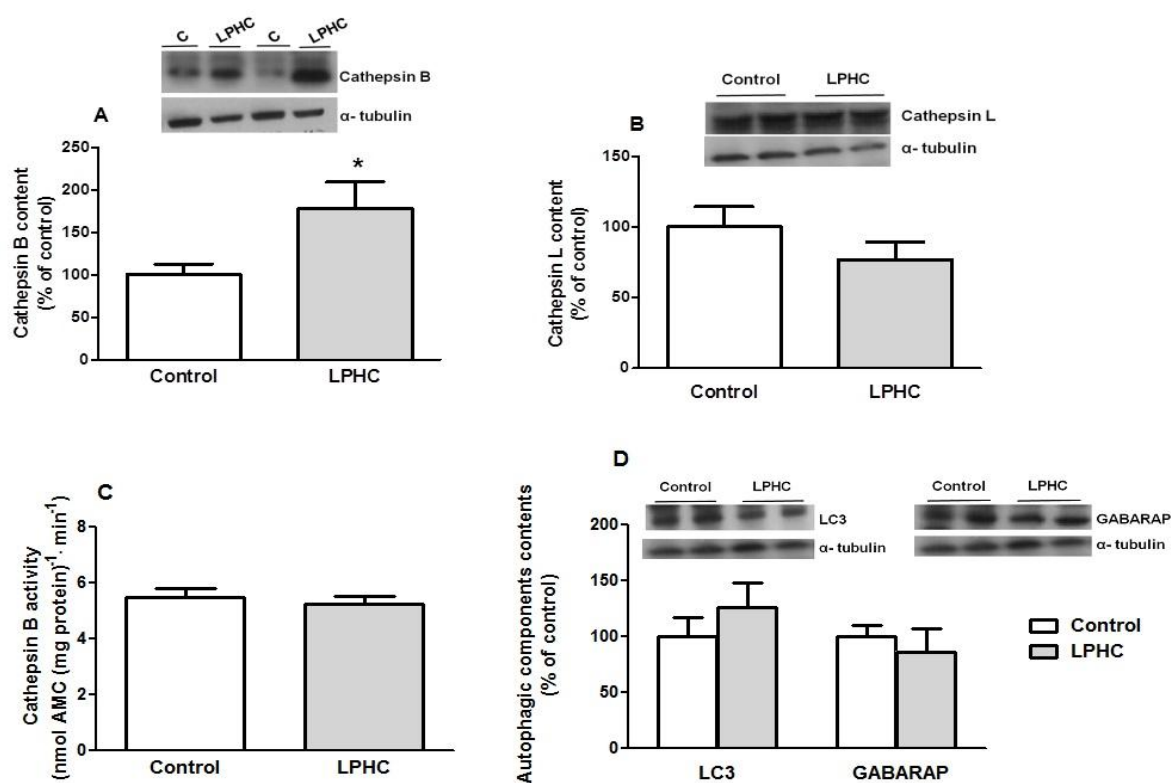


Figura 2: Conteúdo de catepsinas B (A) e L (B), atividade da catepsina B (C) e conteúdo dos componentes autofágicos (D) no músculo EDL de ratos controle (C) e hipoproteico-hiperglicídico (LPHC), após 15 dias de tratamento. Os dados são apresentados como média $\pm$ EP (n=6-8 ratos). *P<0.05 *versus* dieta controle (Student's t test).

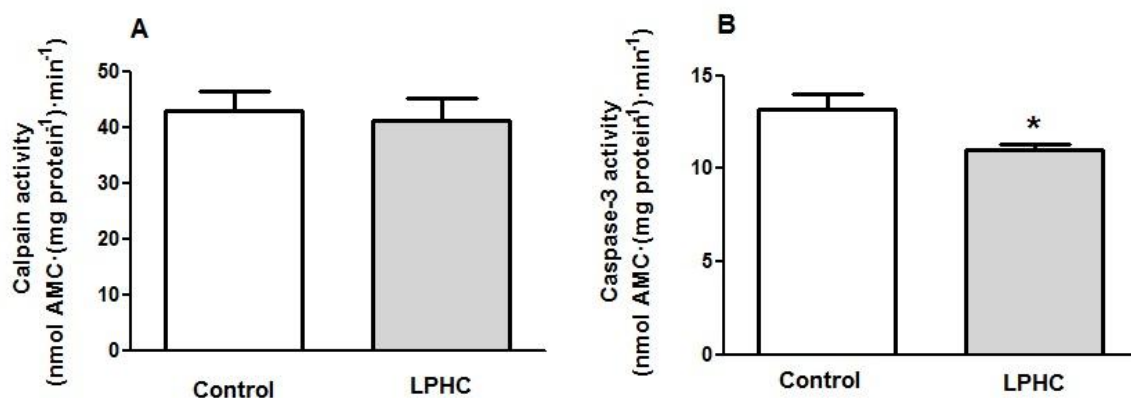


Figura 3: Atividade das calpaínas (A) e da caspase-3 (B) no músculo EDL de ratos controle (C) e hipoproteico-hiperglicídico (LPHC), após 15 dias de tratamento. Os dados são apresentados como média $\pm$ EP (n=6-8 ratos). *P<0.05 *versus* dieta controle (Student's t test).

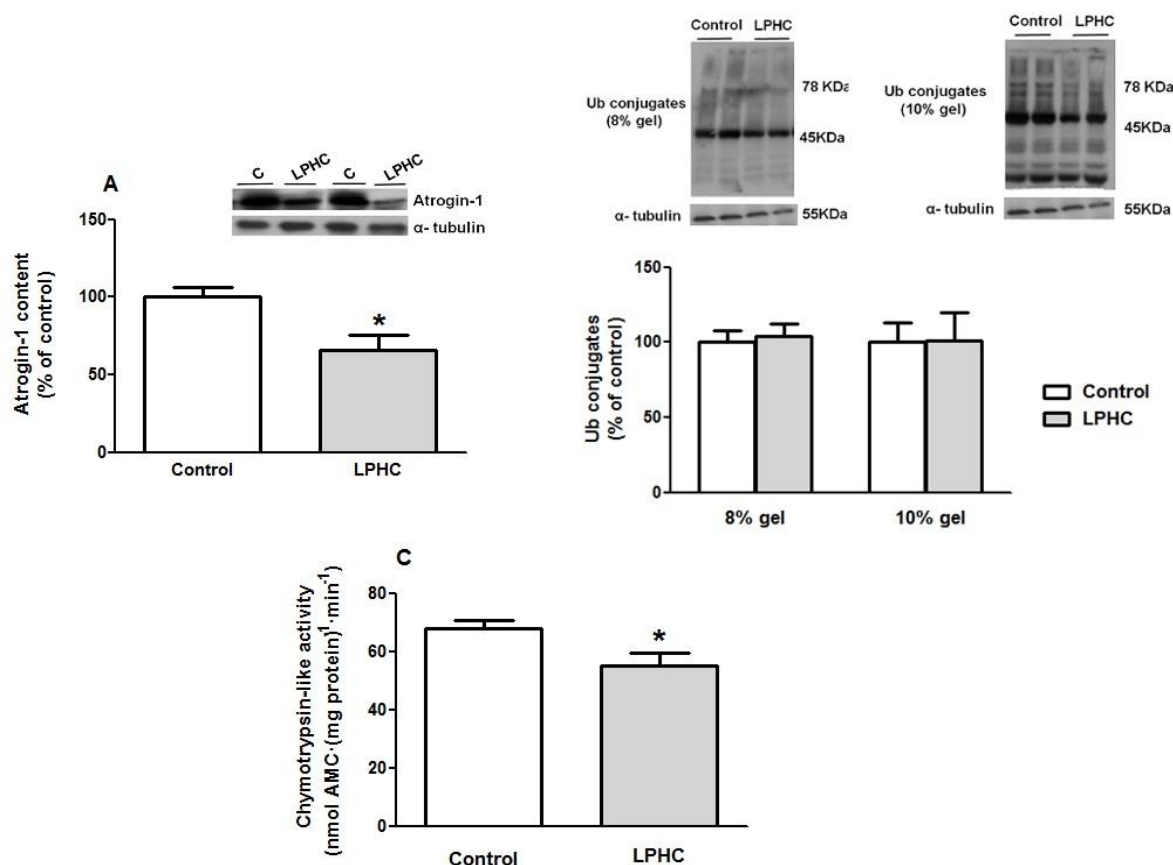


Figura 4: Conteúdos de atrogin-1 (A) e dos conjugados de Ub (B) e atividade da quimotripsina-like (C) no músculo EDL de ratos controle (C) e hipoproteico-hiperglicídico (LPHC), após 15 dias de tratamento. Os dados são apresentados como média $\pm$ EP (n=6-8 ratos). * P<0.05 *versus* dieta controle (Student's t test).

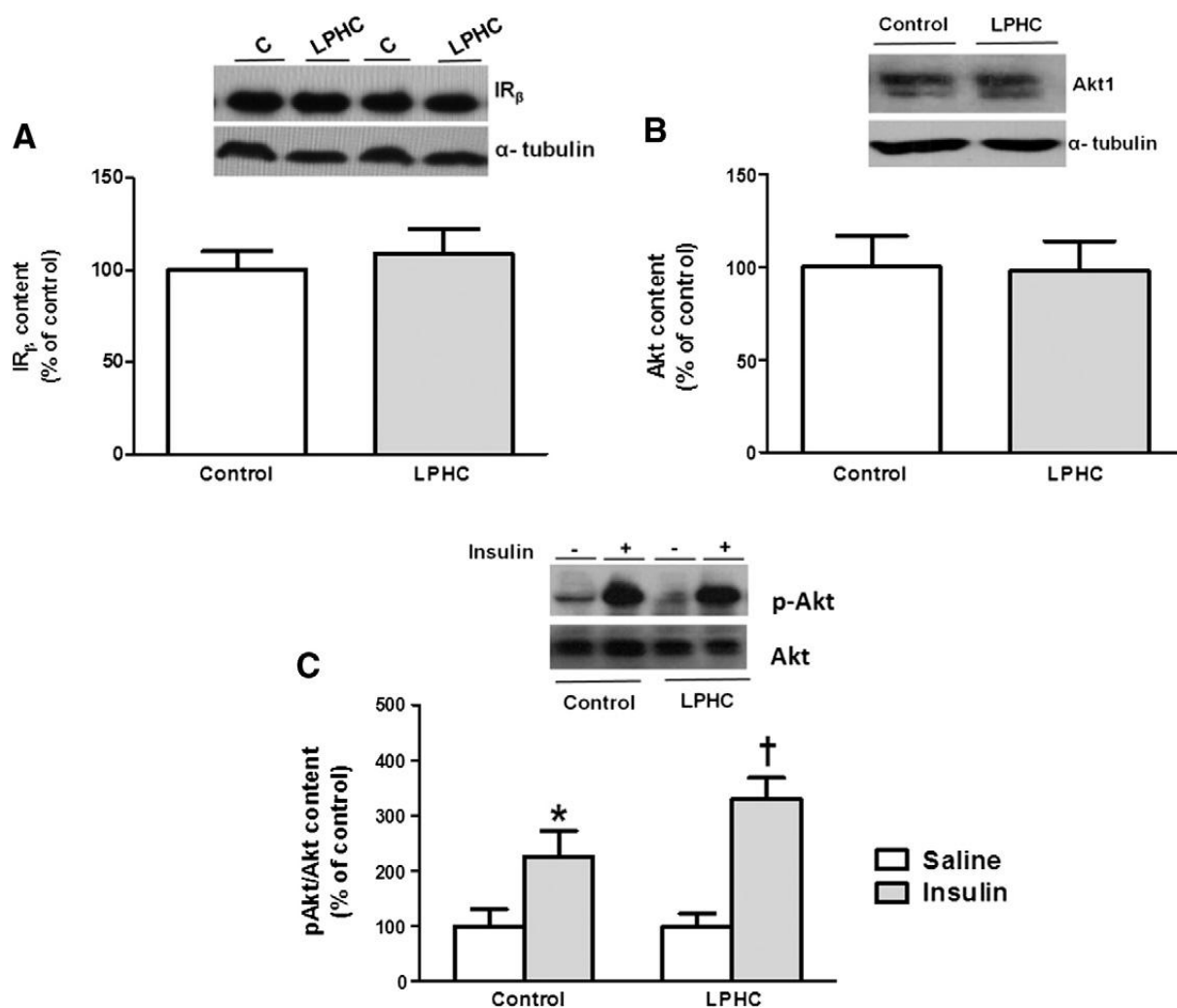


Figura 5: Conteúdos de IR β (A) e Akt (B) e razão p-Akt/Akt (C) no músculo EDL de ratos controle (C) e hipoproteico-hiperglicídico (LPHC), após 15 dias de tratamento. Os dados são apresentados como média $\pm$ EP (n=5-7 ratos por grupo). *P<0,05 *versus* controle salina (Student's t test). $\dagger$ P<0,05 *versus* LPHC salina (Student's t test).

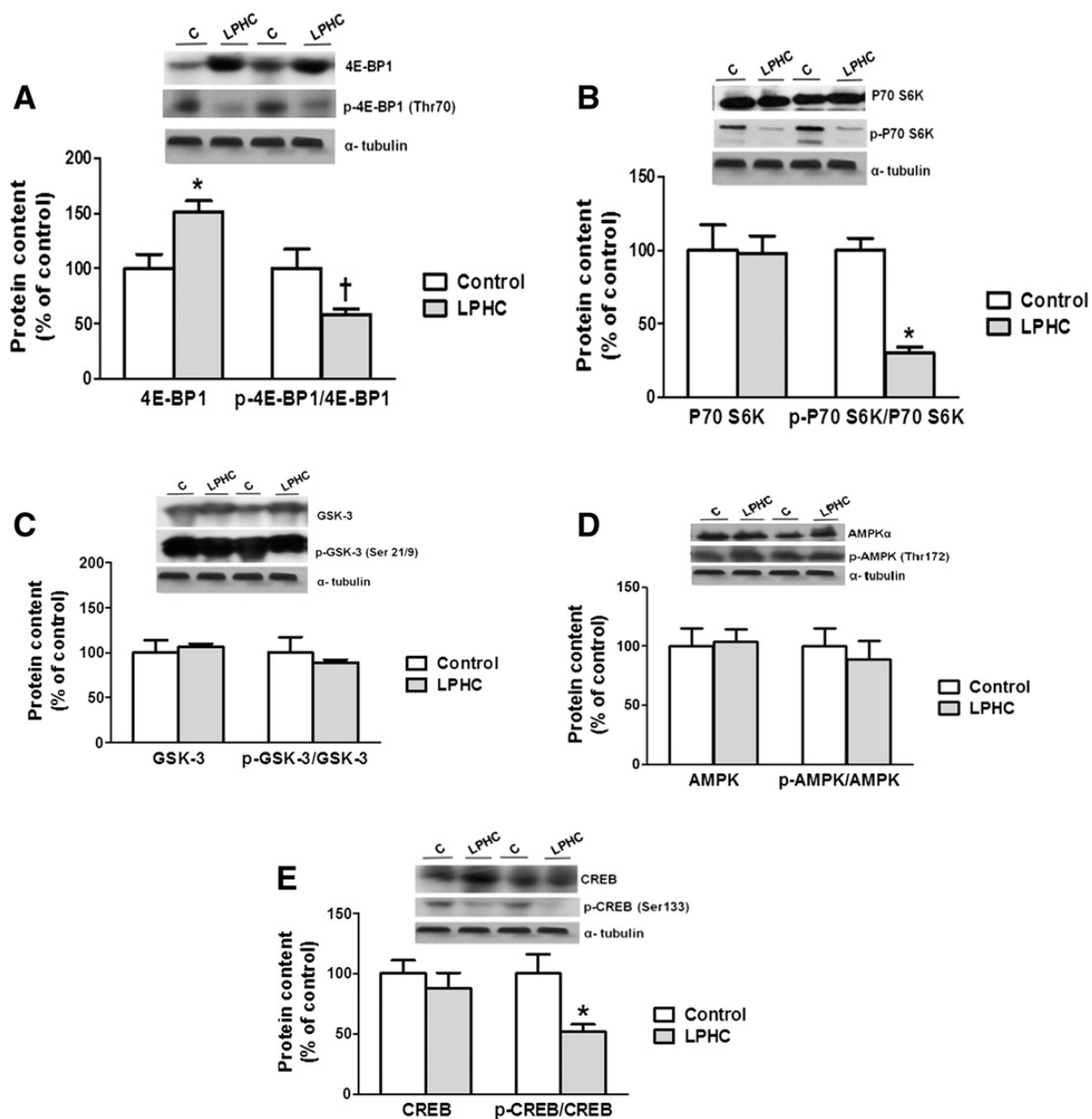


Figura 6: Conteúdo total e razão entre fosforilação/conteúdo total de 4E-BP1 (A), p70^{S6K} (B), GSK-3 β (C), AMPK (D) e CREB (E) no músculo EDL de ratos controle (C) e hipoproteico-hiperglicídico (LPHC), após 15 dias de tratamento. Os dados são apresentados como média $\pm$ EP (n=6 ratos por grupo). *P<0.05 versus dieta controle (Student's t test). †P<0,05 versus dieta controle (Student's t test).

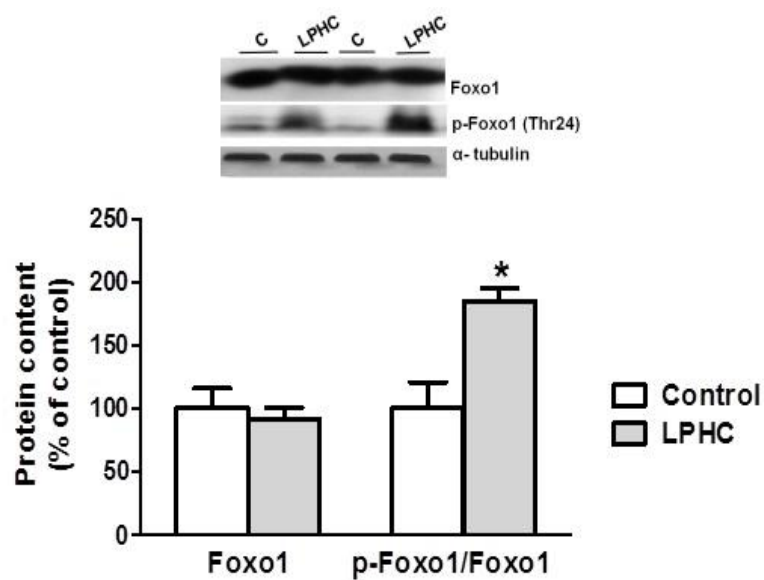


Figura 7: Conteúdo de Foxo1 e razão p-Foxo1/Foxo1 no músculo EDL de ratos controle (C) e hipoproteico-hiperglicídico (LPHC), após 15 dias de tratamento. Os dados são apresentados como média $\pm$ EP (n=6 ratos por grupo). *P<0.05 *versus* dieta controle (Student's t test).

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1: Peso e composição da carcaça de ratos controles (C) e hiporproteico-hiperglicídico (LPHC), após 15 de tratamento.

Parâmetros da carcaça (g)	Controle	LPHC
Peso da carcaça	146,6±3,3	131,5±3,7*
Água	94,6±2,4	77,4±1,9**
Proteínas	31,0±1,0	23,4±0,4**
Lípidios	13,2±1,0	21,7±1,2**
Cinza	7,8± 0,2	9,0±0,4*

Os dados são apresentados como média ± EP de 6 ratos por grupo. *P < 0.05 *versus* ratos controles, **P< 0.01 *versus* ratos controles (Student t-test). Os dados foram previamente publicados por Aparecida de França et al. [13].

Tabela S2: Níveis hormonais e de TNF- α de ratos controle (C) e hipoproteico-hiperglicídico (LPHC), após 15 dias de tratamento.

Hormônios e TNF- α	Controle	LPHC
Ratos alimentados		
Corticosterona (pg·mL ⁻¹)	147,5 ± 1,5	304,1 ± 1,9**
Fator de necrose tumoral- α (pg·mL ⁻¹)	54,3 ± 22,6	588,2 ± 69,6**
Epinefrina (ng·mL ⁻¹)	3,9±0,6	5,4±0,4**
Norepinefrina (ng·mL ⁻¹)	1,9±0,2	2,7±0,3**
Leptina (ng·mL ⁻¹)	4,3±0,70	8,2±1,1**
Insulina (ng·mL ⁻¹)	3,3±0,3	1,4±0,3*

Os dados são apresentados como média ± EP(n=4-12 ratos).

*P<0,05 *versus* ratos controles; **P < 0,01 vs. ratos controle (Student t-test).

Os dados foram previamente publicados por Aparecida de França et al. [13], Buzelle et al. [15] e Dos Santos et al. [16].

Tabela S3: Concentração plasmática de aminoácidos, pós-prandial, de ratos controle (C) e hipoproteico-hiperglicídico (LPHC), após 15 dias de tratamento.

Aminoácido ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)			
†Essencial	Controle	LPHC	% mudanças
Cistina	36,29±1,81	23,46±2,65*	-35
Valina	110,95±4,92	66,67±5,25*	-40
Metionina	44,37±2,02	26,62±0,73*	-40
Isoleucina	52,22±2,68	31,12±1,76*	-40
Leucina	77,86±3,02	52,24±2,87*	-33
Tirosina	39,08±1,87	20,69±1,87*	-47
Fenilalanina	27,08±1,41	22,32±1,51*	-18
Triptofano	45,39±2,26	16,36±2,64*	-64
Histidina	39,42±2,61	41,53±2,37	NS
Lisina	112,90±2,67	110,21±1,48	NS
Não essencial			
Ácido glutâmico	47,83±1,26	62,68±4,64*	+31
Glicina	55,65±3,73	75,59±3,88*	+36
Alanina	137,94±3,45	171,27±3,68*	+24
Ácido aspártico	12,35±2,90	13,33±1,23	NS
Serina	158,05±1,65	157,47±2,21	NS
Arginina	46,01±1,63	42,80±2,73	NS

Os dados são apresentados como média $\pm$ EP; * $p < 0,05$ comparados aos ratos controle (Student's *t* test); NS= não significante. Os dados foram previamente publicados por Batistela et al. [14].

†Aminoácidos essenciais necessários para ratos em crescimento, recomendado por Heger e Frydrych [54].

Referência

[54] Heger J, Frydrych Z. Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake. *Br J Nutr* 1985;54:499–508.

Artigo em Inglês**Higher insulin sensitivity in EDL muscle of rats fed a low-protein, high-carbohydrate diet inhibits the caspase-3 and ubiquitin-proteasome proteolytic systems but does not increase protein synthesis**

Maísa Pavani dos Santos M.Sc.^a, Emanuele Batistela M.Sc.^a, Mayara Peron Pereira M.Sc.^a, Silvia Paula Gomes Ph.D.^b, Neusa Maria Zanon^b, Isis do Carmo Kettelhut Ph.D.^b, Christina Karatzaferi Ph.D.^c, Claudia Marlise Balbinotti Andrade Ph.D.^a, Suélem Aparecida de França Ph.D.^a, Amanda Martins Baviera Ph.D.^d, Nair Honda Kawashita Ph.D.^a

^aDepartment of Chemistry, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

^bDepartment of Biochemistry and Immunology, School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

^cFaculty of Sport and Health Sciences, University of St Mark and St John, Plymouth, United Kingdom

^dDepartment of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University

Tel + 55 to 65 to 3615 to 8765;

Fax: +55 to 65 to 3615 to 8005.

E-mail address: nairhonda@terra.com.br (N. H. Kawashita).

Abstract

Compared with the extensor digitorum longus (EDL) muscle of control rats (C), the EDL muscle of rats fed a low-protein, high-carbohydrate diet (LPHC) showed a 36% reduction in mass. Muscle mass is determined by the balance between protein synthesis and proteolysis; thus, the aim of this work was to evaluate the components involved in these processes. Compared with the muscle from C rats, the EDL muscle from LPHC diet-fed rats showed a reduction (34%) in the *in vitro* basal protein synthesis and a 22% reduction in the *in vitro* basal proteolysis suggesting that the reduction in the mass can be associated with a change in the rate of the two processes. Soon after euthanasia, in the EDL muscles of the rats fed the LPHC diet for 15 days, the activity of caspase-3 and that of components of the ubiquitin-proteasome system (atrogin-1 content and chymotrypsin-like activity) were decreased. The phosphorylation of p70^{S6K} and 4E-BP1, proteins involved in protein synthesis, was also decreased. We observed an increase in the insulin-stimulated protein content of p-Akt. Thus, the higher insulin sensitivity in the EDL muscle of LPHC rats seemed to contribute to the lower proteolysis in LPHC rats. However, even with the higher insulin sensitivity, the reduction in p-E4-BP1 and o p-p70^{S6K} indicates a reduction in protein synthesis, showing that factors other than insulin can have a greater effect on the control of protein synthesis.

Keywords: Low-protein, high-carbohydrate diet; Protein synthesis; Proteolytic pathways; Extensor digitorum longus; Insulin sensitivity; Growing rats.

1. Introduction

In developing countries, malnutrition is an early and usual event in the human life. Normally, children in these countries consume a great amount of carbohydrates and a small quantity of protein, which can lead to structural damage in several organs and increased mortality [1,2].

Skeletal muscle is considered the most abundant tissue in the body, making up approximately 40–50% of the total body mass and serving as the largest body protein pool [3,4]. Skeletal muscle exhibits a high resting metabolic rate and is one of the most adaptable tissues responding to numerous external and physiological stimuli [5], which induce changes in its phenotypic profile in terms of size and composition [6]. Thus, particularly in conditions of protein malnutrition, the adaptations of muscles are fundamental to body homeostasis.

Several authors have suggested that protein restriction during the critical stage of development results in a reduction in the skeletal muscle mass and in the number and size of fibers [7,8], along with higher vulnerability to atrophic reactions [9]. However, other authors have shown that muscle fibers are capable of adapting their metabolism, optimizing protein turnover to preserve the primary functions in malnutrition conditions [10–12].

Studies from our research group showed that rats that were fed a low-protein, high-carbohydrate diet (LPHC; 6% protein and 74% carbohydrate) for 15 days soon after weaning showed an increase in the diet and calorie intake with a reduction in the body weight gain compared to the corresponding factors in the rats fed a control diet (C; 17% protein and 63% carbohydrate) [13]. Even when the increase in the food intake was accounted for, the LPHC rats ingested 60% less protein than the rats fed the C diet at the end of 15 days, which was confirmed by the reduced postprandial amino acid concentration in the blood of these rats [13]. The protein-deficient state in LPHC rats could also be indicated by the hypoproteinemia and impairment in the body growth (evaluated by Lee index) compared to the condition of the rats receiving a C diet [13]. Moreover, LPHC rats showed a reduction in the body mass with a higher energetic gain as a consequence of an increase in the body lipid content and a reduction in the water and protein contents [13] (data are shown in Table S1 of the supplementary material). Additionally, the LPHC diet promotes an increase in serum epinephrine and norepinephrine levels, as well as 10 times higher levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and 100% higher levels of corticosterone and leptin

[13,15,16] (data are shown in Table S2 of the supplementary material); thus, the LPHC diet seems to promote a highly catabolic environment. A previous study also showed a reduction in the mass of different skeletal muscles in LPHC rats compared with C rats [13].

The mass and protein content of skeletal muscle are determined by the dynamic equilibrium between the rates of protein synthesis and proteolysis [6]. In addition to the availability of essential amino acids, insulin and the insulin-like growth factor (IGF-1) are considered to be factors that mediate normal muscle development [17,18]. These factors bind with their respective receptors, resulting in activation/phosphorylation of protein kinase B, also known as Akt. Akt stimulates protein synthesis by activating the mammalian target of rapamycin (mTOR) and its downstream effectors and inhibits glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), a negative regulator of protein synthesis [19]. Activation of Akt also induces the phosphorylation of the forkhead box transcription factor (Foxo) and its subsequent nuclear exclusion, which results in the inhibition of atrogene transcription and consequently in the inhibition of proteolysis [20].

In turn, there are different proteolytic systems in cells. Intracellular proteolysis may occur in lysosomes after fusion with the autophagosome, which requires the expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (LC3) and gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein (GABARAP). The proteolytic capacity of the lysosomes is determined by the activity of cathepsins L, B, D and H [21]. Extralysosomal proteolytic pathways in the skeletal muscle cells of mammals include the calpains or Ca²⁺-dependent proteases, caspase-3 and the ubiquitin-proteasome proteolytic system [14]. The specificity in protein breakdown by this last proteolytic system is dependent on the content of ubiquitin ligase enzymes (E3s). Two E3s, muscle F-box protein (atrogen-1 or MAFbx) and the protein muscle RING finger-1 (MuRF-1) are known as atrogenes, and they play a decisive role in mediating the loss of muscle mass [20]. Studies indicate the participation of calpains and caspase-3 in the dissociation of actin and myosin from myofibrils before they are degraded by the proteasome [22,23].

A previous study on soleus muscles of LPHC rats showed that the reductions in mass and protein content resulted from decreases in protein synthesis [14] and overall proteolysis. The proteolysis was reduced mainly due to inhibition of both the ubiquitin-proteasome system and caspase-3 activity [14]. The results also indicated

higher insulin sensitivity in the soleus muscles of the LPHC rats, which was evidenced by increases in the insulin receptor content and in insulin-stimulated Akt phosphorylation [14], suggesting that the higher insulin sensitivity in the soleus muscle of the LPHC rats was responsible for the inhibition of the proteolytic processes.

However, the alterations observed in the protein metabolism of the soleus muscles from LPHC rats are not necessarily valid for other skeletal muscles because the metabolic response in different metabolic situations seems to be muscle-type specific. Differences in the sensitivity of skeletal muscles to dietary manipulations have also been reported by several authors. Mizushima et al. [24] showed that transgenic mice subjected to nutrient starvation experienced rapid and intense macroautophagy in the extensor digitorum longus (EDL) muscle, which almost exclusively contains fast-twitch fibers (glycolytic, type II), and experienced moderate and slow macroautophagy in the soleus muscles, which contains a high percentage of slow-twitch fibers (oxidative, type I). Furthermore, the regulation of extralysosomal proteolytic pathways can differ in skeletal muscles with different fiber-type compositions [25,26].

Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of the LPHC diet on components of the systems for protein synthesis and proteolysis as the first stage in establishing possible mechanisms that explain the reduced mass of EDL muscle. For this purpose, we evaluated the following in EDL muscles from control and LPHC rats: (1) mass and protein content of the EDL muscle; (2) in vitro basal protein synthesis and proteolysis; (3) protein contents and enzyme activities related to proteolytic pathways; (4) insulin signaling pathway protein content; (5) basal and phosphorylated contents of 4E-BP1, p70^{S6K}, GSK-3 β , CREB and AMPK, which are proteins involved in the regulation of protein synthesis; and (6) basal and phosphorylated content of Foxo1, which is involved in the regulation of proteolysis.

2. Methods and materials

2.1. Animals and treatment

The animals used in the experiments were provided by the Central Animal House of Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). The animals were handled according to the Brazilian College of Animal Experimentation Regulations, and the experiments were approved by the Animal Ethics Committee of UFMT (protocol no. 23,108.043335/08-1). Male Wistar rats (5–10 animals per group) with an initial body

weight of approximately 90–100 g (~30 days old) were randomly distributed into two groups: (i) control group (C) that was fed a diet composed of 17% protein, 63% carbohydrate and 7% lipid and (ii) LPHC group that was fed a diet composed of 6% protein, 74% carbohydrate and 7% lipid. The reduction of protein in the LPHC diet, in term of calories, was compensated by carbohydrates (Table 1). The diets are isocaloric (16.3 kJ/g) and were administered for 15 days. The rats were housed in individual metabolic cages at 22 ± 1 °C with a 12 h:12 h light:dark cycle; they also received water and food ad libitum. The body weight and food intake of each rat were recorded daily. All rats were euthanized on the 15th day of treatment, and the EDL muscles were collected, weighed and stored at -80°C or immediately used in experiments. All experiments were conducted with fed rats except to insulin signaling pathway.

2.2. Total protein content of the EDL skeletal muscle

For the LPHC and C fed rats, both EDL muscles (right and left) were used for the analysis. The muscles were minced and homogenized using a glass-Teflon homogenizer (Wheaton Overhead Stirrer) in buffer containing 50 mM potassium phosphate dibasic, 5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1.15% KCl, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 5 µg/mL aprotinin and 1 µg/mL leupeptin at pH 7.4 in a proportion of 4% wt/vol. The homogenate was centrifuged at 600g for 10 min at 4°C . The total protein content was determined by the Bradford method [27], and the data are expressed in milligrams per gram muscle.

2.3. In vitro, basal protein synthesis and proteolysis

Groups of rats were treated with the C or LPHC diet. After 15 days of treatment, the animals in the fed state were euthanized, and the muscles were removed and incubated for the in vitro evaluation of the protein synthesis. The same process was performed with another set of rats from the C and LPHC groups for the evaluation of muscle proteolysis.

The EDL muscles were rapidly dissected, weighed and fixed by the tendon in appropriate supports (to maintain the muscles at the resting length) and were incubated in Erlenmeyer flasks (1 muscle/flask) containing Krebs-Ringer bicarbonate buffer (0.120 M NaCl, 0.015 M NaHCO_3 , 4.828 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 1.212 mM KH_2PO_4 and 2.4 mM CaCl_2 at pH 7.4) and 5 mM glucose, aerated with 95% O_2 and 5% CO_2 . The in vitro basal protein synthesis was evaluated as previously described

[14,28]. After a 1-h preincubation period at 37°C with shaking, the EDL muscles were incubated in the same Krebs-Ringer bicarbonate buffer described above containing all amino acids at concentrations similar to those of the rat plasma during fed period [29] and L-[U-¹⁴C] tyrosine (0.05 µCi/ml) for 2 h. After the incubation, the specific activity of the intracellular tyrosine pool in each muscle was estimated by measuring the radioactivity and the concentration of free tyrosine. After measurement of the radioactivity incorporated into the protein of the same muscle, the in vitro basal protein synthesis was calculated using the specific activity of the intracellular pool of tyrosine, assuming that there was no recycling of the label during the incubation period [14].

The in vitro basal proteolysis was evaluated as previously described [14,30], by determination of the tyrosine release in the medium. After a 1-h preincubation period at 37°C with shaking, the EDL muscles were incubated for 2 h in the same Krebs-Ringer bicarbonate buffer described above without any amino acids in the medium but with 0.5 mM cycloheximide to prevent protein synthesis and the reincorporation of the released tyrosine back into proteins. At the end of the incubation period, 1 mL of the medium was collected and added to 0.25 mL of perchloric acid (1.5 N), and the released tyrosine was evaluated using the fluorimetric method described by Waalkes and Udenfriend [31].

2.4. Enzyme activities

The activities of caspase-3, calpain, cathepsin B and proteasome (chymotrypsin-like activity) were determined fluorometrically (PerkinElmer) with excitation and emission wavelengths of 380 and 460 nm, respectively. The protein content of the muscle homogenates was determined by the Bradford method [27]. The enzyme proteolytic activities were determined by measurement of the released fluorogenic product (AMC; 7-amino-4-methylcoumarin), and a standard curve of AMC was prepared (Calbiochem). Data are expressed in nanomoles of AMC per milligram of protein per minute.

Chymotrypsin-like proteasome activity was assayed according to Klaude et al. [32]. EDL muscles were homogenized in Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ and 1.8 mM ATP. The homogenate was centrifuged at 700g at 4°C for 10 min to remove cell debris. The supernatant was centrifuged at 15,000g for 10 min. Glycerol was then added to the supernatant (10% vol/vol), which was used to measure the total protease activity. Duplicates of the

supernatant were incubated with the assay buffer (50 mM Tris–HCl, 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂ and 1 mM DTT; pH 7.5), and 150 µM substrate succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Calbiochem, Germany) was added after 1 min of stabilization. In parallel, the same incubation procedure was performed with the addition of proteasome inhibitor (100 µM MG132; Sigma Aldrich) to the mixture. After incubation at 37°C for 45 min, the reaction was stopped by the addition of 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.3). The proteasome activity was determined by the difference between the amounts of AMC generated in the absence and the presence of MG132.

Calpain activity was assayed according to Douillard et al. [33]. EDL muscles were homogenized in Tris–HCl buffer (pH 7.4) containing 20 mM Tris–HCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100 and 1 mM DTT. The homogenates were centrifuged at 1000g at 4°C for 10 min to remove cell debris. The calpain activity was measured using the same substrate mentioned above. Duplicates of the supernatant were incubated with the assay buffer (20 mM Tris–HCl, 5 mM CaCl₂ and 1 mM DTT; pH 7.4), and after 5 min, the substrate was added (50 µM). In parallel, the same incubation procedure (at 37°C for 30 min) was performed with the addition of calpain inhibitor (50 µM calpeptin; Santa Cruz Biotechnology) to the mixture (20 mM Tris–HCl, 10 mM EDTA and 1 mM DTT; pH 7.4). The reaction was stopped by the addition of the stop buffer (100 mM sodium chloroacetate, 30 mM sodium acetate and 70 mM acetic acid; pH 4.3). The calpain activity was determined by the difference between the amounts of AMC generated in the absence and presence of calpeptin.

Caspase-3 activity was determined as described by Du et al. [22], with minor modifications. Briefly, 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 15,000g for 45 min. The supernatant was added to the assay buffer (100 mM Hepes, 10 mM DTT and 10% sucrose; pH 7.5), and the mixture was preincubated at 30°C for 30 min. The substrate for caspase-3, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (Calbiochem, Germany), was added (50 µM), and the mixture was incubated at 30°C for 60 min. The reaction was stopped by the addition of 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.3). The caspase-3 activity was determined considering data from the standard curve of AMC.

Cathepsin B activity was determined as described by Barrett and Kirschke [34]. Briefly, EDL muscles were homogenized in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.15 M KCl and 0.1% Triton X-100 and centrifuged at 15,000g at 4°C for 10 min. Duplicates of the supernatant were pre-incubated with assay buffer (340 mM

sodium acetate, 60 mM acetic acid, 4mM EDTA and 8 mM DTT; pH 5.5) at 30°C. After 1 min, 20 μ M of the substrate for cathepsin B (Z-Arg-Arg-AMC, 2 HCl; Calbiochem) was added. The reaction was stopped after 20 min by the addition of the same stop buffer used in the calpain activity evaluation. The cathepsin B activity was determined considering data from the standard curve of AMC.

2.5. *Insulin signaling study*

Rats from the C or LPHC groups were fasted for 5 h and were then intraperitoneally injected with saline (C and LPHC nonstimulated groups) or insulin (10 mU/g body weight; C and LPHC stimulated groups). Ten minutes after the insulin or saline administration, the animals were anesthetized with a mixture of ketamine hydrochloride (Dopalen, Agribrands) and xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer) (2:1), and after the loss of pedal and corneal reflexes, the EDL muscles were quickly removed. The protein content of the insulin receptor IR β and Akt and the p-Akt protein content were determined through Western blotting.

2.6. *Western blot for protein analysis*

EDL muscles from C and LPHC rats were homogenized in 50 mM Tris–HCl buffer pH 7.4, at 4°C, containing 1% Triton X-100, 150 mM sodium chloride, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 1 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride and 5 μ g/mL aprotinin. The total protein concentration was determined by the Bradford method [27]. For each sample, 100 μ l of total homogenate was incubated for 5 min at 100°C with Laemmli buffer (0.250 mM Tris–HCl buffer at pH 6.8, 0.5% bromophenol blue, 50% glycerol, 10% sodium dodecyl sulfate and 500 mM dithiothreitol) (4:1, vol/vol). Samples containing 100 μ g of protein were separated by 8–10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with the following antibodies: anti-cathepsin L (1:500; Santa Cruz), anti-cathepsin B (1:500; Santa Cruz), anti-ubiquitin conjugates (1:1000; Santa Cruz), anti-LC3 (1:1000; Santa Cruz), anti-GABARAP (1:1000; Santa Cruz), anti-AMPK (1:1000; Cell Signaling), anti-phospho-[Thr-172]-AMPK (1:1000; Cell Signaling), anti-IR β (1:750; Santa Cruz), anti-Akt (1:500; Santa Cruz), anti-phospho-[Ser-473]-Akt1/2/3 (1:500; Santa Cruz), anti-CREB (1:750; Cell Signaling), anti-phospho-[Ser-33]-CREB (1:750; Cell Signaling), anti-Foxo1 (1:500; Cell Signaling), anti-phospho-[Thr-24]-Foxo1 (1:500; Cell Signaling), anti-atrogin-1 (1:1000; c), anti-4E-BP1 (1:500; Cell Signaling), anti-phospho-[Thr-70]-4E-BP1 (1:500; Cell

Signaling), anti-p70S6K (1:500; Cell Signaling), anti-phospho-[Thr70]- p70S6K (1:500; Cell Signaling), anti-GSK-3 β (1:500; Cell Signaling), anti-phospho-[Ser-21/9]-GSK-3 (1:500; Cell Signaling) and anti- α -tubulin (1:750; Santa Cruz). All antibodies used are recommended for the detection of rat proteins. Proteins were detected after membrane incubation overnight (4°C) in the respective primary antibodies diluted in TBS-T containing 5% dry albumin. Specific bands were detected with a Supersignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce), and the protein band intensity was normalized to the α -tubulin band intensity (internal control). The band intensity was quantified with the ImageJ Program (Wayne Rasband, National Institutes of Health, New York, NY), and the results are expressed as the relative ratio using the internal control as the baseline.

2.7. Statistical analysis

All data were expressed as the mean $\pm$ standard error (SE) for the number of rats indicated between parentheses. Statistical analysis was performed using the Statistica Software package (Statsoft, Tulsa, OK). Bartlett's test for the homogeneity of variances was initially used to determine whether the data complied with the assumptions for parametric analysis of variance. When necessary, the data were log transformed to correct for variance in heterogeneity or non normality. All statistical significances of the other experiments were analyzed using Student's t test. The sample size used in all experiments was calculated by considering a 15% coefficient of variation for the biological effect [35]. A value of $p < 0.05$ was taken as the criterion for significance.

3. Results

3.1. General physiological and biochemical parameters.

At the end of the 15th day of treatment, the total food intake of the LPHC rats was approximately 13% higher than that of the control rats. However, despite this increase in the food intake, the total protein intake and final body weight of the LPHC rats were 61% and 23% lower, respectively, than the control rats. These data are in agreement with previously published results by our laboratory [13–16]. The reduction in body weight of the LPHC rats was accompanied by a reduction in the mass (36%) and protein content (34%) of the EDL muscles (Table 2) compared with the values of the control rats.

3.2. *In vitro*, basal protein synthesis and proteolysis

The *in vitro* protein synthesis was markedly lower (34%) in the EDL muscles of the LPHC rats than in the control rats (Fig. 1A). Moreover, the LPHC diet caused a 22% reduction in the *in vitro* proteolysis in EDL muscles compared with the values found in control rats (Fig. 1B).

3.3. *Proteolytic pathways*

Evaluation of the components of the lysosomal system showed that the EDL muscles from the LPHC rats had approximately 52% higher protein content of cathepsin B (Fig. 2A), without changes in the cathepsin L content (Fig. 2B). Despite the increase in the content of cathepsin B, the activity of this protease was similar between the LPHC and C groups (Fig. 2C). Additionally, there were no differences in the protein contents of the autophagic components, LC3 and GABARAP in the EDL muscles (Fig. 2D) of LPHC rats compared to C rats. Proteases related to sarcomere structure proteolysis were also evaluated. The LPHC diet had no effect on the calpain activity of EDL muscles (Fig. 3A). However, the activity of caspase-3 was 16% lower in the EDL muscles of LPHC rats than in the control rats (Fig. 3B). Data from the ubiquitin-proteasome system evaluation showed that the atrogin-1 content was 34% lower in the EDL muscles of the LPHC rats (Fig. 4A). There were no differences in the levels of the ubiquitin conjugates of high and low molecular weight in the EDL muscles (Fig. 4B). The chymotrypsin-like proteasome activity (Fig. 4C) in the EDL muscles was 19% lower in the LPHC rats than in the control rats.

3.4. *Insulin signaling*

There were no differences in the protein contents of IR β and Akt in the EDL muscles of the experimental groups (Figs. 5A and 5B). In the control rats, the insulin-stimulated Akt phosphorylation was increased by 125% compared with the noninsulin stimulated value. In LPHC rats, this increase was approximately 230% relative to the basal LPHC (Fig. 5C).

3.5. *Basal and phosphorylated contents of 4E-BP1, p70S6K, GSK-3 β , CREB and AMPK (regulation of protein synthesis)*

The evaluation of the contents of protein components involved in the translation process showed that the 4E-BP1 content was 50% higher in EDL muscles from LPHC rats than in C rats; however, the 4E-BP1 phosphorylation levels were 42%

lower (Fig. 6A). Similarly, there was a significant reduction (70%) in the phospho-p70^{S6K} levels in the EDL muscles from LPHC rats, although the LPHC diet did not affect the p70^{S6K} content (Fig. 6B). No difference was observed in the GSK-3 and p-GSK-3/GSK-3 ratio in the EDL muscles between the LPHC and C rats (Fig. 6C). We investigated the AMPK and p-AMPK contents because this kinase has an important role in the inhibition of protein synthesis by suppression of the function of multiple translation regulatory factors. Neither the AMPK protein content nor the p-AMPK/AMPK ratio was altered by treatment with the LPHC diet for 15 days (Fig. 6D). The cAMP-response-element binding protein CREB is a well known transcription factor target of the cAMP-dependent protein kinase PKA and is considered the major effector of cAMP in skeletal muscles. The CREB levels were similar in the EDL muscle of the two groups. However, the LPHC diet reduced the levels of phosphorylated CREB by 48% (Fig. 6E).

3.6. Basal and phosphorylated content of Foxo1 (regulation of proteolysis)

The Foxo1 factor is implicated in the reduction of muscle protein breakdown by reduction of atrogene expression via Akt. The Foxo1 content was not altered by the diet, but the Foxo1 phosphorylation was 85% higher in the EDL muscles of the LPHC rats than in the C rats (Fig. 7).

4. Discussion

In vivo and in vitro experiments were performed in the present study with the objective of obtaining insight into the protein metabolism in EDL muscles of growing rats adapted to the LPHC diet. Our investigation showed a reduction in the mass and protein content of the EDL muscle of LPHC rats compared with C rats. Thus, initially, we evaluated the in vitro basal protein synthesis and proteolysis in EDL muscles from LPHC and C rats using specific media for each evaluations. We observed that the EDL muscle from the LPHC rats showed less incorporation of ¹⁴C-tyrosine and also less tyrosine release in the medium, suggesting lower protein synthesis and proteolysis, respectively. However, the reduction in the ¹⁴C-tyrosine incorporation by the muscle was higher than the reduction in the tyrosine release by the incubated muscle. These results can explain the reduction in the EDL muscle mass. Batistela et al. [14] performed the same analyses in the same conditions in the soleus muscle of LPHC rats. Comparing our EDL data with the data obtained from the soleus muscle [14], we observed that the reduction in the protein synthesis was lower in the soleus

(~19%) than in the EDL (~34%), whereas the inhibition of the protein breakdown was more pronounced in the soleus muscles (~36%) than in the EDL (~22%). These results are consistent with the higher mass loss of EDL compared with the soleus muscle in LPHC rats: 37% and 27%, respectively. The fact that the changes in the activity of these two processes define the mass of the muscle is also valid for other muscles and in other situations. Millward et al. [12] observed that, in the gastrocnemius and quadriceps skeletal muscles of rats fed a diet composed of 6.8% protein, the reduced mass observed in those muscles resulted from the reduction in the rates of both protein synthesis and breakdown.

Interestingly, EDL muscles of the LPHC rats showed higher insulin sensitivity, as evidenced by higher levels of insulin-stimulated Akt phosphorylation. After binding to its receptor in the plasma membrane of cells, insulin causes receptor autophosphorylation and activation of the signaling cascade, thus activating mTOR via Akt. mTOR plays a critical role in the regulation of protein synthesis and in the hypertrophy of skeletal muscles [18] because it promotes enhanced translation through its downstream targets, the 70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p70^{S6K}) and the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein (4E-BP1), which has a main role in the activation of the initiation stage of the translation process in eukaryotic cells. However, our results showed that the levels of phosphorylated p70^{S6K} and phosphorylated 4E-BP1 in the EDL muscles of LPHC rats were both reduced although the insulin signaling is increased, which explains the lower rate of protein synthesis despite the increase in Akt phosphorylation. Thus, it is clear that, in addition to insulin, other factors can affect or stimulate protein synthesis. In our experimental animal, the amino acid availability seems to be a limiting factor. Nave et al. [36] showed in mammal cells that both the mTOR phosphorylation and the protein synthesis that occurred in response to insulin were blocked by amino acid deprivation, showing that mTOR represents a potential integration point of signals from insulin and amino acids. The administration of essential amino acids, mainly leucine, also results in an increase in the protein synthesis in skeletal muscle through activation of the mTOR pathway [37,38]. Moreover, in situations when the protein synthesis in rat skeletal muscle is lower due to a low level of protein in the diet, it is possible to reverse the reduction in the protein synthesis by supplementation with leucine [39] or lysine [40]. Previously, we demonstrated that, in the post feeding period of LPHC rats, the plasma levels of lysine were unaffected, but the leucine levels were reduced by 30% compared with the value in control rats [14] (data are

shown in Table S3 of the supplementary material). Taken together, these data suggest that the reduced levels of leucine may represent an important factor in the reduction of the protein synthesis in the EDL muscles of LPHC rats. Additional experiments are necessary to prove this possibility.

For proteolytic pathways, our data showed that the contents of autophagy-related genes (LC3 and GABARAP) and cathepsin L, as well as the cathepsin B activity, remained unchanged in LPHC rats compared with C rats. These data suggest that the lysosomal proteolytic system is not involved in the reduction of the EDL skeletal muscle of LPHC rats. However, the inhibition of both the caspase-3 activity and ubiquitin-proteasome system in the EDL muscle of LPHC rats can reinforce the reduced proteolysis observed in the EDL muscle in vitro. The inhibition of the ubiquitin-proteasome system was evidenced by the decreases in both the atrogin-1 content and the chymotrypsin-like proteasome activity. The expression of atrogenes, including atrogin-1, is inhibited by the PI3K/Akt insulin signaling, which is responsible for the phosphorylation of the nuclear Foxo transcription factor, which is excluded from the nucleus when phosphorylated [41]. Our data showed that the EDL muscles from LPHC rats had an increase in the phosphorylation of Foxo1 accompanied by a reduction in the atrogin-1 content, representing a minor decrease in the amount of substrates that are offered to the proteasome. These novel results reinforce the data obtained from the in vitro evaluation of proteolysis, when we observed lower tyrosine release in the medium, and this finding is consistent with the higher insulin-stimulated Akt phosphorylation in the EDL muscle of LPHC rats.

The proteasome is unable to degrade intact myofibrils [42], so upstream proteases are responsible for the release of myofibrillar proteins from the sarcomere for the subsequent ubiquitination and proteasomal degradation. Calpains [43] and caspase-3 [22,44] are involved in the dissociation of myofibrils. According to our data, the activity of calpains was unchanged in the EDL muscles of LPHC rats, but a reduction in the caspase-3 activity was observed. Insulin has been also reported as an inhibitor of caspase-3 in skeletal muscles. Under muscle atrophy conditions, such as diabetes or chronic uremia, the accumulation of a 14-kDa actin fragment generated by the cleavage of actomyosin and cleaved by caspase-3 is observed [22]. When incubated in medium lacking metabolic substrates, L6 muscle cells showed an increase in actin cleavage; however, when insulin was added to the medium, the actin cleavage was blocked by a mechanism requiring PI3K [22]. Thus, it can be concluded that the decreased activity of caspase-3 in association with the decreased expression of

atrogin-1 may be related the decreased availability of substrates for the proteasome in the EDL of LPHC rats. In the soleus muscle of LPHC rats, Batistela et al. [14] also observed similar changes in the proteolytic pathways and higher insulin sensitivity, with an increase in the IR β content and in the insulin-stimulated Akt phosphorylation. However, in contrast to the findings in EDL muscle, the AMPK and p-AMPK content in the soleus muscle increased. Studies have shown that AMPK enhances the insulin sensitivity of some skeletal muscles [45,46], and this effect has an important role in the inactivation of proteolysis and other catabolic pathways.

As we previously noted, LPHC rats showed an increase in the circulating levels of corticosterone, TNF- α [16] and leptin [13] (Table S2; supplementary material), which have an inhibitory effect on protein synthesis. The results obtained in this present study suggested that these factors do not seem to have a significant effect on the reduced protein synthesis in the EDL muscle. The inhibitory action of TNF- α on protein synthesis occurs mainly via inhibition of the phosphorylation of IRS-1 at Ser307 [47], thus preventing the activation of other proteins downstream of insulin signaling, such as Akt. In this study, we did not find changes in the basal p-Akt content of the EDL muscles of LPHC rats, suggesting that, despite the increase in the serum TNF- α level in LPHC rats, this cytokine did not inhibit the insulin signaling in the tissue. The inhibitory effect of glucocorticoids on protein synthesis occurs via activation of GSK-3 β , a downstream target of insulin/Akt signaling that suppresses protein synthesis by inhibiting the eukaryotic transcription factor 2B-dependent translation (eIF2B) [48]. In contrast, leptin decreases protein synthesis by impairing mTOR phosphorylation through activation of the AMPK pathway [49,50]. In the present study, we did not observe changes in the GSK-3 β and AMPK contents or in the phosphorylation levels of these proteins in the EDL muscles of LPHC rats. This fact suggests that the high levels of corticosterone and leptin in LPHC rats are not a determining factor in the reduction of the protein synthesis in EDL muscle.

LPHC rats exhibited higher epinephrine and norepinephrine levels (Table S2; supplementary material) [15]. Numerous studies have shown that the administration of β_2 -agonists positively regulates skeletal muscle mass [41,51]. The β_2 -adrenergic signaling pathway involves the activation of the G α_s protein, which in turn activates adenylate cyclase, resulting in increased cAMP production. Cyclic AMP-activated PKA initiates the transcription of many target genes via the phosphorylation of CREB at Ser133. In fact, CREB phosphorylation occurs rapidly in skeletal muscles in response to β_2 -adrenergic stimuli [51]. Furthermore, β_2 -adrenergic stimulation in

skeletal muscle leads to the release of the $G_{\beta\gamma}$ subunit, which in turn activates PI3K/Akt/mTOR signaling and thus induces protein synthesis [51]. In the present study, a 48% reduction in the phosphorylation of CREB in the EDL muscles of LPHC rats was observed. In addition, the unaltered basal p-Akt levels suggest that β_2 -adrenergic stimulation is not evoked in the EDL muscles of LPHC rats despite the increase in plasma catecholamine levels, suggesting that adrenergic signaling was not involved in the reduction of protein synthesis.

Thus, our results suggest that, despite the changes in the circulating levels of hormones and pro-inflammatory cytokines in LPHC rats, which strongly influenced the carbohydrate and lipid metabolism in the liver [52] and adipose tissues that were already reported in other studies [15,16,53], these factors are not the main determinants of protein metabolism in the EDL muscle.

In summary, the following can be concluded:

- (i) The increase in the insulin sensitivity of EDL muscles of the LPHC rats contributes to the reduced proteolysis through a reduction in the activity of caspase-3 and the ubiquitinproteasome system.
- (ii) The lower rate of protein synthesis in the EDL muscle of LPHC rats is probably linked to inhibition of the phosphorylation of mTOR as a consequence of the lower availability of specific amino acids, suggesting that the protein synthesis is directly affected by the quantity and quality of the amino acids from dietary protein.

Acknowledgments

The authors acknowledge Air Francisco Costa, Celso Roberto Afonso and Cristina Helena Alves for their technical assistance. This work was supported by grants from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT 286326/2010 and FAPEMAT 222560/2015).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.04.008>.

References

- [1] Patel MS, Srinivasan M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. *Ann Nutr Metab* 2011;58:18–28.

- [2] Steyn NP, Mchiza Z, Hill J, Davids YD, Hinrichsen E, Opperman M, et al. Nutritional contribution of street foods to the diet of people in developing countries: a systematic review. *Public Health Nutr* 2013;17:1–12.
- [3] Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 2015;96:183–95.
- [4] Liu Z, Long W, Fryburg DA, Barrett EJ. The regulation of body and skeletal muscle protein metabolism by hormones and amino acids. *J Nutr* 2006;136:212S–7S.
- [5] Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* 2013;280:4294–314.
- [6] Matsakas A, Patel K. Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histol Histopathol* 2009;24:611–29.
- [7] Prescod AL, Halliday WC, Taylor CG. Protein deficiency, but not zinc deficiency, reduces recovery of type 1 and type 2 muscle fibre diameters in the gastrocnemius muscle of growing rats. *Br J Nutr* 2011;106:675–82.
- [8] Alves AP, Dâmaso AR, Dal PV. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. *J Pediatr* 2008;84:264–71.
- [9] Kim JY. Hindlimb muscle atrophy occurs from short-term undernutrition in rats. *Biol Res Nurs* 2013;15:459–64.
- [10] Tawa Jr NE, Goldberg AL. Suppression of muscle protein turnover and amino acid degradation by dietary protein deficiency. *Am J Physiol* 1992;263:E317–25.
- [11] Da Silva AR, Guzmán-Quevedo O, Pérez-García G, Toscano AE, Gois Leandro C, Manhães-de-Castro R, et al. Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition. *Acta Physiol* 2014;210:70–83.
- [12] Millward DJ, Garlick PJ, Stewart RJ, Nnanyelugo DO, Waterlow JC. Skeletal-muscle growth and protein turnover. *Biochem J* 1975;150:235–43.
- [13] Aparecida de França S, Dos Santos MP, Garófalo MA, Navegantes LC, Kettelhut Ido C, Lopes CF, et al. Low protein diet changes the energetic balance and sympathetic activity in brown adipose tissue of growing rats. *Nutrition* 2009;25:1186–92.
- [14] Batistela E, Pereira MP, Siqueira JT, Paula-Gomes S, Zanon NM, Oliveira EB, et al. Decreased rate of protein synthesis, caspase-3 activity, and ubiquitin-proteasome

proteolysis in soleus muscles from growing rats fed a low-protein, high-carbohydrate diet. *Can J Physiol Pharmacol* 2014;92:445–54.

[15] Buzelle SL, Santos MP, Baviera AM, Lopes CF, Garófalo MA, Navegantes LC, et al. A low-protein, high-carbohydrate diet increases the adipose lipid content without increasing the glycerol-3-phosphate or fatty acid content in growing rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88:1157–65.

[16] Santos MP, França SA, Santos JT, Buzelle SL, Bertolini GL, Garófalo MA, et al. A low-protein, high-carbohydrate diet increases fatty acid uptake and reduces norepinephrine-induced lipolysis in rat retroperitoneal white adipose tissue. *Lipids* 2012;47:279–89.

[17] Pasiakos SM, McClung JP. Supplemental dietary leucine and the skeletal muscle anabolic response to essential amino acids. *Nutr Rev* 2011;69:550–7.

[18] Yoshizawa F. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:417–22.

[19] Dupont E, Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Stevens L. Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;300:R408–17.

[20] Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;307:E469–84.

[21] Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:2098–114.

[22] Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* 2004;113:115–23.

[23] Smith IJ, Dodd SL. Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the AKT signaling pathway in rat diaphragm muscle. *Exp Physiol* 2007;92:561–73.

[24] Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004;15:1101–11.

[25] Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Muscle wasting associated with cancer cachexia is linked to an important activation of the ATP dependent ubiquitin-mediated proteolysis. *Int J Cancer* 1995;29(61):138–41.

- [26] Graça FA, Gonçalves DA, Silveira WA, Lira EC, Chaves VE, Zanon NM, et al. Epinephrine depletion exacerbates the fasting-induced protein breakdown in fast-twitch skeletal muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E1483–94.
- [27] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [28] Navegantes LC, Resano NM, Baviera AM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E642–7.
- [29] Scharff R, Wool IG. Effect of diabetes on the concentration aminoacids in plasma and heart muscle of rats. *Biochem J* 1966;99:173–8.
- [30] Pepato MT, Migliorini RH, Goldberg AL, Kettelhut IC. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol* 1996;271:E340–7.
- [31] Waalkes TP, Udenfriend S. A fluorimetric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J Lab Clin Med* 1957;50:733–6.
- [32] Klaude M, Fredriksson K, Ader ITJ, Hammarqvist F, Ahlmans B, Rooyackers O, et al. Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis. *Clin Sci* 2007;112:499–506.
- [33] Douillard A, Galbes O, Begue G, Rossano B, Levin J, Vernus B, et al. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:364–72.
- [34] Barret AJ, Kirschke H. Cathepsin B, cathepsins H and cathepsins L. *Methods Enzymol* 1981;80:535–61.
- [35] Scheibe PO. Number of samples — hypothesis testing. *Nucl Med Biol* 2008;35:3–9.
- [36] Nave BT, Ouwens DM, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino acid deficiency on protein translation. *Biochem J* 1999;344:427–31.
- [37] Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr* 2005;135:376–82.
- [38] Donato Jr J, Pedrosa RG, Cruzat VF, Pires IS, Tirapegui J. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. *Nutrition* 2006;22:520–7.

- [39] Gao X, Tian F, Wang X, Zhao J, Wan X, Zhang L, et al. Leucine supplementation improves acquired growth hormone resistance in rats with protein-energy malnutrition. *PLoS One* 2015;10:e0125023.
- [40] Sato T, Ito Y, Takashi NT. Dietary l-lysine suppresses autophagic proteolysis and stimulates Akt/mTOR signaling in the skeletal muscle of rats fed a low-protein diet. *J Agric Food Chem* 2015;63:8192–8.
- [41] Manfredi LH, Zanon NM, Garófalo MA, Navegantes LC, Kettelhut IC. Effect of shortterm cold exposure on skeletal muscle protein breakdown in rats. *J Appl Physiol* 2013;115:1496–505.
- [42] 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* 1996;271:26690–7.
- [43] Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci* 2008;86:E19–35.
- [44] Lee SW, Dai G, Hu Z, Wang X, Du J, Mitch WE. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1537–45.
- [45] Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 2007;100:328–41.
- [46] Wang P, Zhang RY, Song J, Guan YF, Xu TY, Du H, et al. Loss of AMP-activated protein kinase impairs the insulin-sensitizing effect of calorie restriction in skeletal muscle. *Diabetes* 2012;61:1051–61.
- [47] Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665–8.
- [48] Jefferson LS, Fabian JR, Kimball SR. Glycogen synthase kinase-3 is the predominant insulin-regulated eukaryotic initiation factor 2B kinase in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:191–200.
- [49] Miyazaki M, Esser KA. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J Appl Physiol* 2009;106:1367–73.
- [50] Berdeaux R, Stewart R. Intracellular signal for skeletal muscle adaptation cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303:E1–17.

- [51] Sato S, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Muscle plasticity and β 2-adrenergic receptors: adaptive responses of β 2-adrenergic receptor expression to muscle hypertrophy and atrophy. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:729598.
- [52] Menezes AL, Pereira MP, Buzelle SL, Dos Santos MP, de França SA, Baviera AM, et al. A low-protein, high-carbohydrate diet increases de novo fatty acid synthesis from glycerol and glycerokinase content in the liver of growing rats. *Nutr Res* 2013;33:494–502.
- [53] Aparecida de França S, Pavani Dos Santos M, Nunes Queiroz da Costa RV, Froelich M, Buzelle SL, Chaves VE, et al. Low-protein, high-carbohydrate diet increases glucose uptake and fatty acid synthesis in brown adipose tissue of rats. *Nutrition* 2014;30:473–80.

Tables

Table 1: Compositions (g/kg) of the control and low-protein, high-carbohydrate diets.

Ingredients	Control diet	LPHC diet
Casein (84% protein)	202	71.5
Cornstarch	397	480
Dextrinized cornstarch	130.5	159
Sucrose	100	121
Soybean oil	70	70
Fiber (cellulose)	50	50
Mineral mix (AIN 93 G)*	35	35
Vitamin mix (AIN 93 G)*	10	10
L-cystine	3	1
Choline bitartrate	2.5	2.5

*For the detailed composition, see Reeves et al. (1993).

Table 2: The total food and protein intake, initial and final body weights, mass and protein content of the EDL muscle of low-protein, high-carbohydrate (LPHC) rats and of control rats after 15 days of treatment.

Parameter	Control	LPHC
Initial body weight (g)	93.57±1.14	93.08±1.41
Final body weight (g)	191.52±2.95	148.05±6.88*
Total food intake (g)	216.69± 6.32	244.96±9.57*
Total protein intake (g)	36.83±1.02	14.70±0.61*
EDL mass (g)	0.176± 0.012	0.113 ± 0.005**
Muscle protein content (mg·g ⁻¹ muscle)	213.50±8.24	140.98±8.98**

The data are the mean ± SEM of rats (n=8-10 rats).

*P<0.05 vs. control rats; **P<0.01 vs. control rats (Student t-test).

Figures

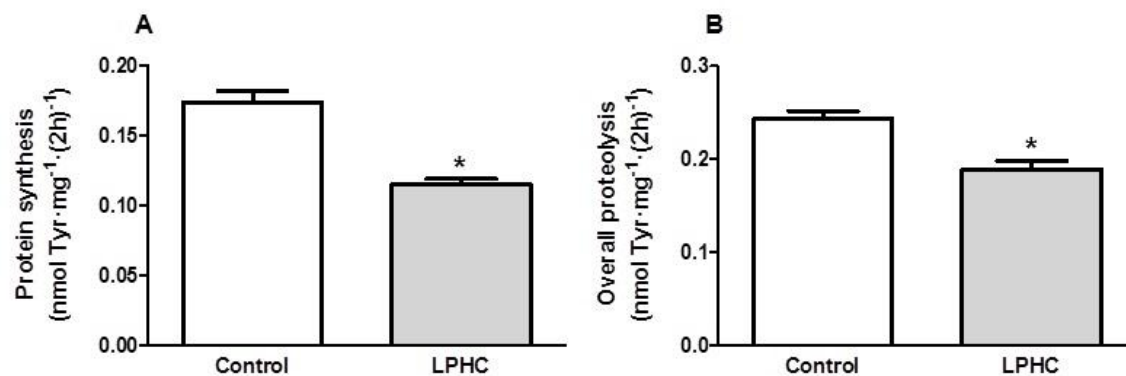


Fig. 1: In vitro basal protein synthesis (A) and proteolysis (B) in the EDL muscle of control and low-protein, high-carbohydrate (LPHC) rats after 15 days of treatment. The data are presented as the mean $\pm$ SE (n=6-8 rats per group). * P<0.05 versus control diet (Student's t test).

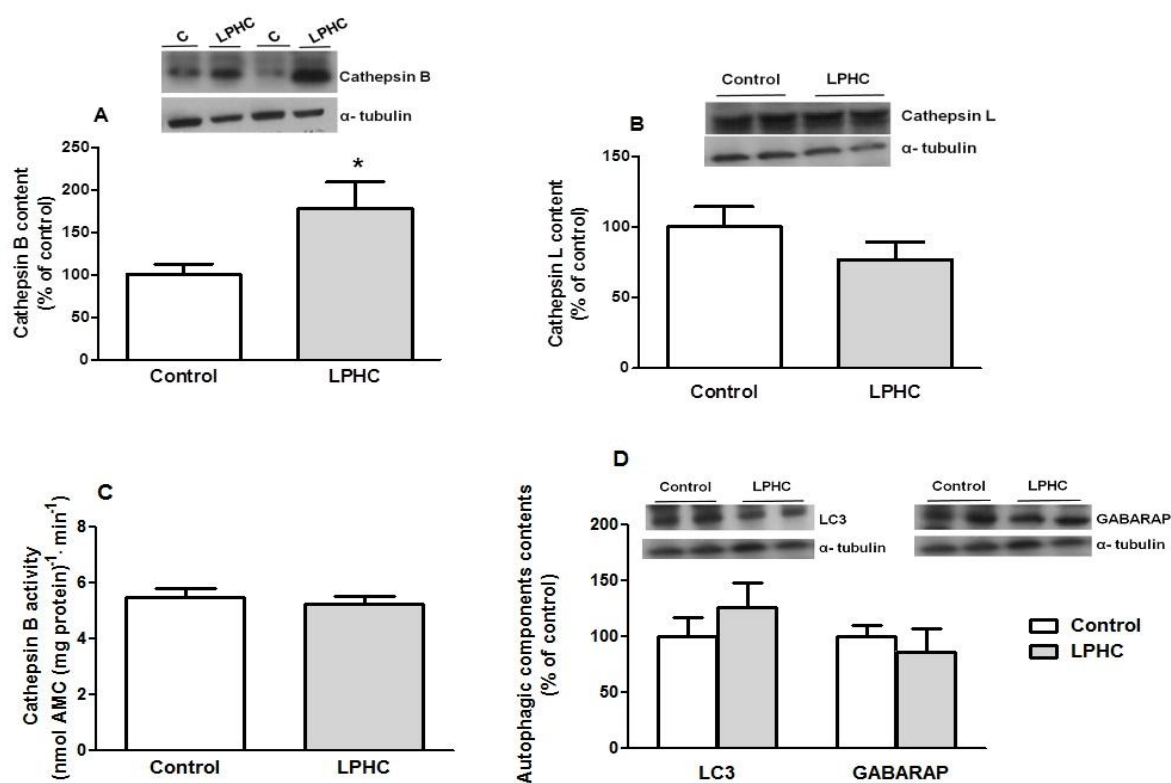


Fig. 2: Protein content of cathepsins B (A) and L (B), cathepsin B activity (C) and protein content of autophagic components (D) in the EDL muscles of control and low-protein, high-carbohydrate (LPHC) rats after 15 days of treatment. The data are presented as the mean $\pm$ SE (n=6-8 rats per group). *P<0.05 versus control diet (Student's t test).

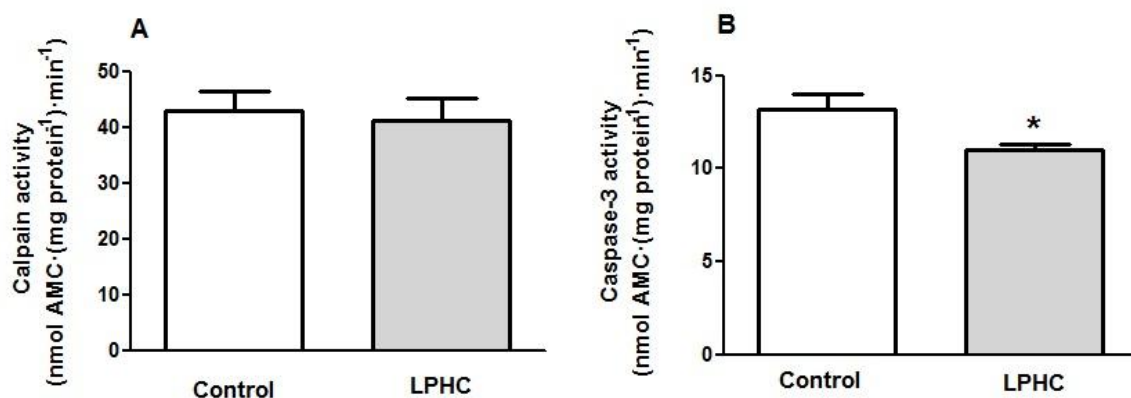


Fig. 3: Activities of calpain (A) and caspase-3 (B) in the EDL muscles of control and low-protein, high-carbohydrate (LPHC) rats after 15 days of treatment. The data are presented as the mean $\pm$ SE (n=8-10 rats per group). *P<0.05 versus control diet (Student's t test).

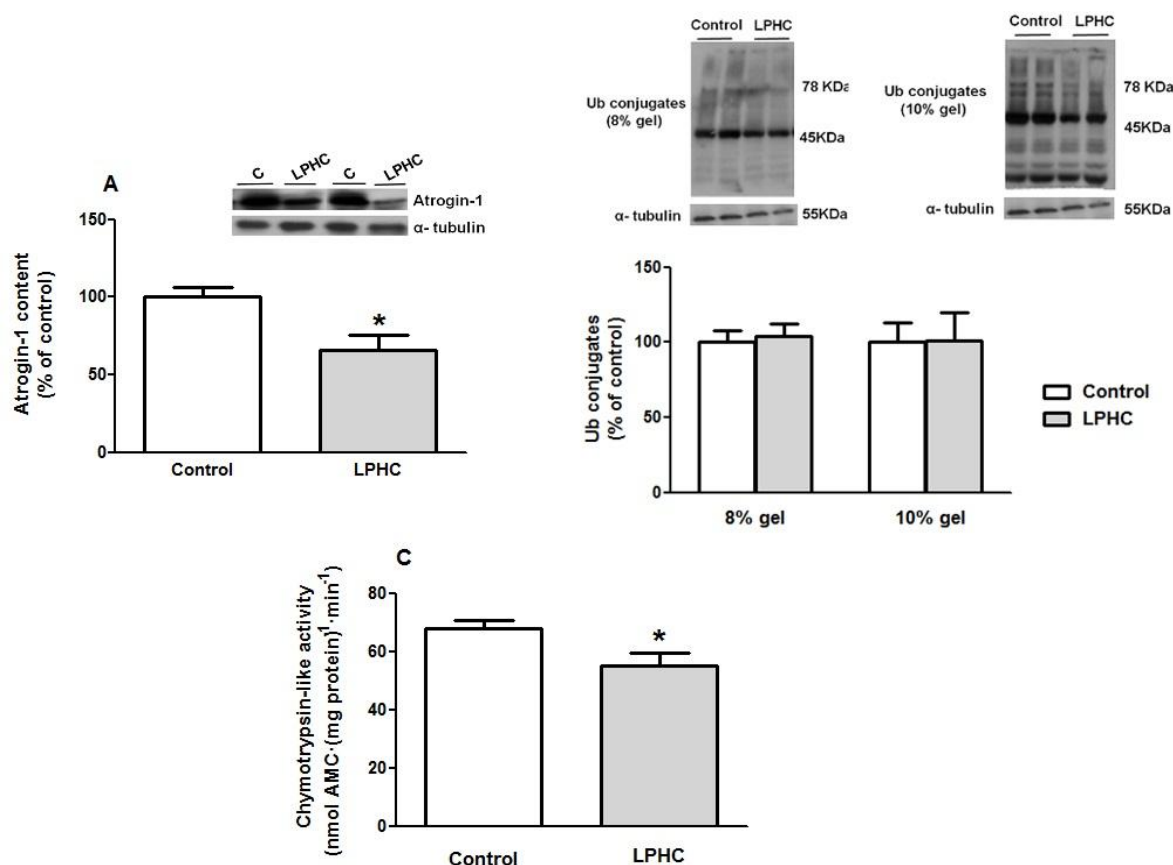


Fig. 4: Protein content of atrogin-1 (A) and Ub conjugates (B) and chymotrypsin-like proteasome activity (C) in the EDL muscles of control and low-protein, high-carbohydrate (LPHC) rats after 15 days of treatment. The data are presented as the mean $\pm$ SE (n=8-10 rats per group). *P<0.05 versus control diet (Student's t test).

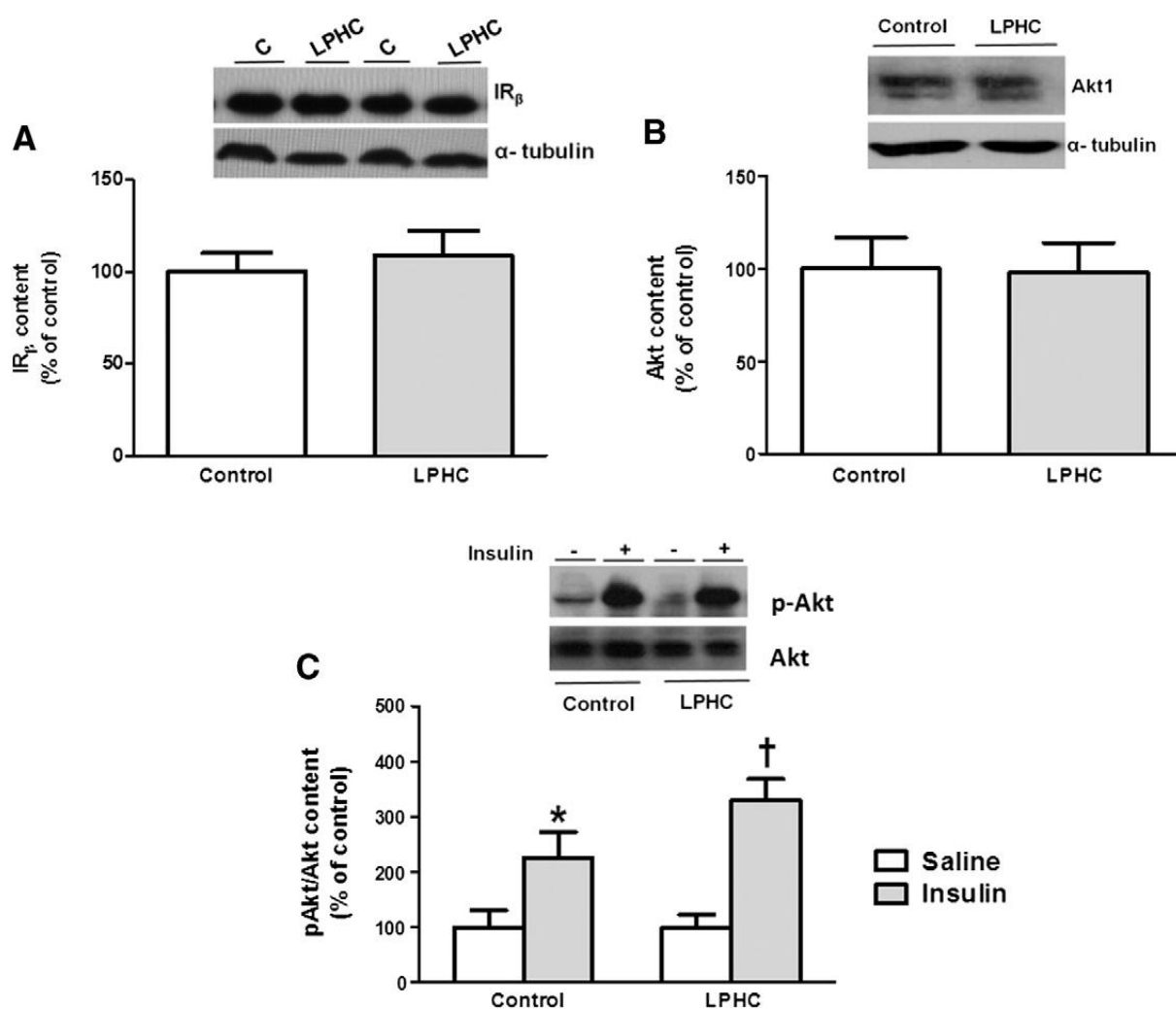


Fig. 5: Protein content of IR β (A) and AKT (B) and p-AKT/AKT ratio (C) in the EDL muscles of control and low-protein, high-carbohydrate (LPHC) rats after 15 days of treatment. The data are presented as the mean $\pm$ SE (n=5-7 rats per group). *P<0.05 versus control saline (Student's t test). [†]P<0.05 versus LPHC saline (Student's t test).

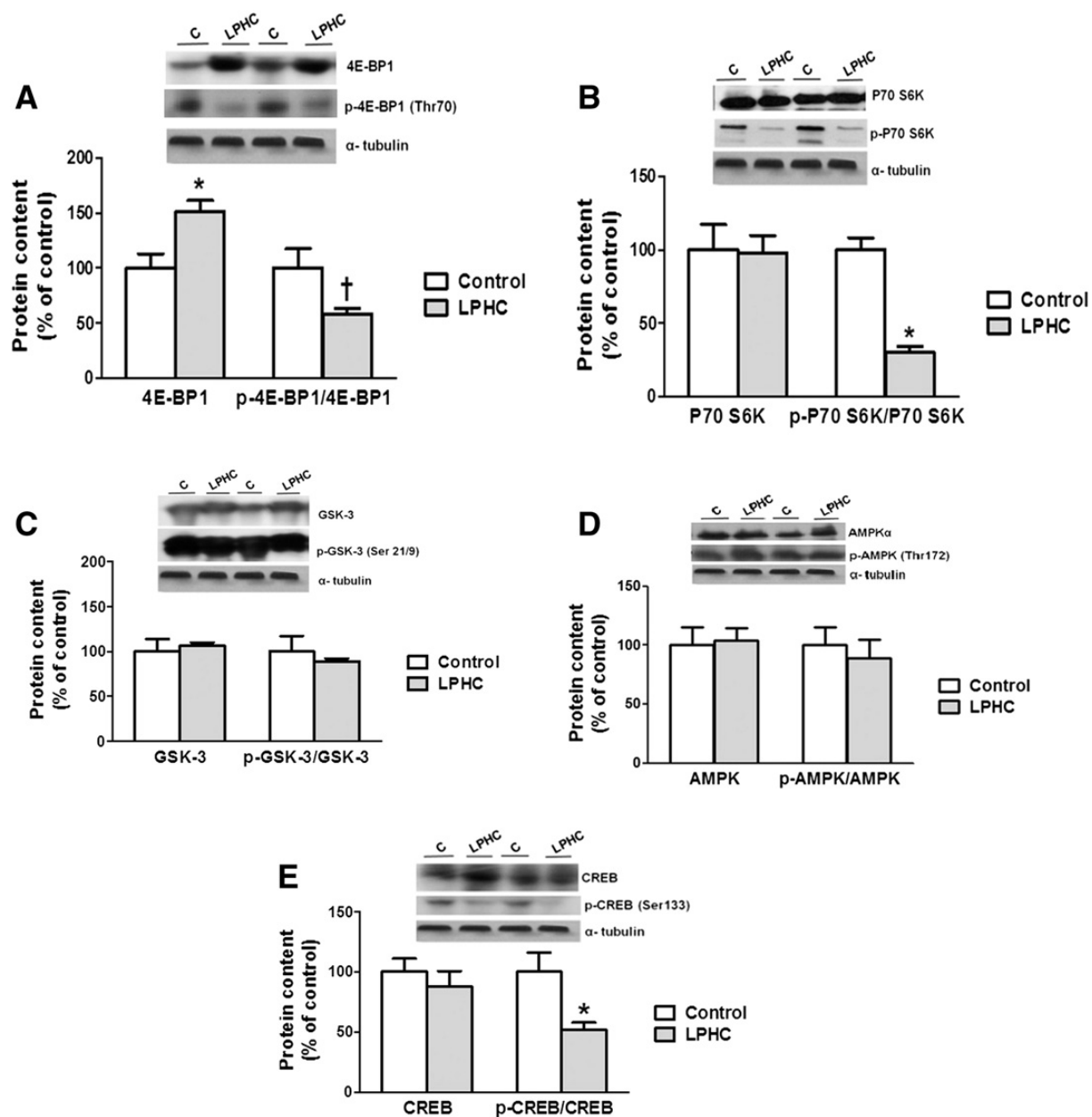


Fig. 6: Total content and phosphorylated/total ratio of 4E-BP1 (A), p70^{S6K} (B), GSK-3 β (C), AMPK (D) and CREB (E) in the EDL muscles of control and low-protein, high-carbohydrate (LPHC) rats after 15 days of treatment. The data are presented as the mean $\pm$ SE (n=6 rats per group). *P<0.05 versus control (Student's t test). $\dagger$ P<0.05 versus control (Student's t test).

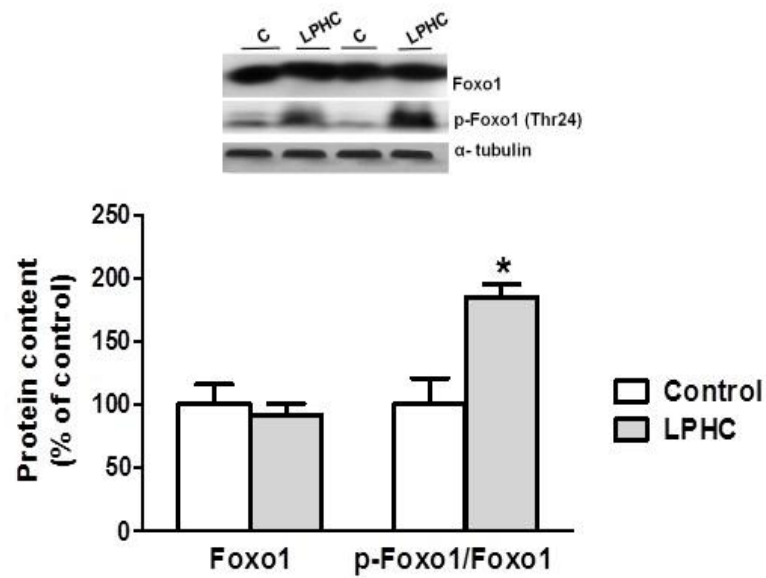


Fig. 7: Foxo1 content and p-Foxo1/Foxo1 ratio in the EDL muscles of control and low-protein, high-carbohydrate (LPHC) rats after 15 days of treatment. The data are presented as the mean $\pm$ SE (n=6 rats per group). *P<0.05 versus control diet (Student's t test).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1: Weight and composition of the carcasses of low-protein, high-carbohydrate (LPHC) rats and control rats after 15 days of treatment.

Carcass parameter (g)	Control	LPHC
Carcass weight	146.6±3.3	131.5±3.7*
Water	94.6±2.4	77.4±1.9**
Protein	31.0±1.0	23.4±0.4**
Lipids	13.2±1.0	21.7±1.2**
Ash	7.8± 0.2	9.0±0.4*

The data are the mean ± SEM of rats (n=6 rats). *P < 0.05 versus. control rats, **P < 0.01 versus. control rats (Student t-test). The data were previously published by Aparecida de França et al. [13].

Table S2: Hormone and TNF-α levels of low-protein, high-carbohydrate (LPHC) rats and control rats after 15 days of treatment.

Hormones and TNF-α	Control	LPHC
Fed rats		
Corticosterone (pg·mL ⁻¹)	147.5 ± 1.5	304.1 ± 1.9**
Tumor necrosis factor-α (pg·mL ⁻¹)	54.3 ± 22.6	588.2 ± 69.6**
Epinephrine (ng·mL ⁻¹)	3.9±0.6	5.4±0.4**
Norepinephrine (ng·mL ⁻¹)	1.9±0.2	2.7±0.3**
Leptin (ng·mL ⁻¹)	4.3±0.70	8.2±1.1**
Insulin (ng·mL ⁻¹)	3.3±0.3	1.4±0.3*

The data are the mean ± SEM of rats (n=4-12 rats).

*P < 0.05 versus. control rats; **P < 0.01 versus. control rats (Student t-test).

The data were previously published by Aparecida de França et al. [13], Buzelle et al. [15] and Santos et al. [16].

Table S3: Post-feeding plasma amino acid levels of low-protein, high-carbohydrate (LPHC) rats and control rats after 15 days of treatment.

Amino acid ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)			
†Essential	Control	LPHC	% change
Cysteine	36.29 $\pm$ 1.81	23.46 $\pm$ 2.65*	-35
Valine	110.95 $\pm$ 4.92	66.67 $\pm$ 5.25*	-40
Methionine	44.37 $\pm$ 2.02	26.62 $\pm$ 0.73*	-40
Isoleucine	52.22 $\pm$ 2.68	31.12 $\pm$ 1.76*	-40
Leucine	77.86 $\pm$ 3.02	52.24 $\pm$ 2.87*	-33
Tyrosine	39.08 $\pm$ 1.87	20.69 $\pm$ 1.87*	-47
Phenylalanine	27.08 $\pm$ 1.41	22.32 $\pm$ 1.51*	-18
Tryptophan	45.39 $\pm$ 2.26	16.36 $\pm$ 2.64*	-64
Histidine	39.42 $\pm$ 2.61	41.53 $\pm$ 2.37	NS
Lysine	112.90 $\pm$ 2.67	110.21 $\pm$ 1.48	NS
Non-essential			
Glutamic acid	47.83 $\pm$ 1.26	62.68 $\pm$ 4.64*	+31
Glycine	55.65 $\pm$ 3.73	75.59 $\pm$ 3.88*	+36
Alanine	137.94 $\pm$ 3.45	171.27 $\pm$ 3.68*	+24
Aspartic acid	12.35 $\pm$ 2.90	13.33 $\pm$ 1.23	NS
Serine	158.05 $\pm$ 1.65	157.47 $\pm$ 2.21	NS
Arginine	46.01 $\pm$ 1.63	42.80 $\pm$ 2.73	NS

Note: Data are the mean $\pm$ SEM; * $p < 0.05$ compared with the control (Student's t test); NS= not significant. The data were previously published by Batistela et al. [14].
 †Essential amino acid necessary for growing rats, recommended by Heger and Frydrych [54].

Reference

[54] Heger J, Frydrych Z. Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake. Br J Nutr 1985;54:499–508.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 23108.043335/08-1, sobre "Metabolismo de proteínas na musculatura esquelética de ratos em crescimento submetidos à restrição protéica", sob a responsabilidade de **Dr^a Amanda Martins Baviera**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA)-UFMT em reunião ordinária de 11/03/2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.043335/08-1, entitled "Protein metabolism in skeletal muscle from growing rats adapted to low protein diet", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **March 11, 2009**.

Cuiabá-MT, 11 de março de 2009.

Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente

Profª M.Sc. Sandra Izilda S. de Figueiredo
Vice-Presidente