

SUSANA AMARAL TEIXEIRA

**AGONISTAS β -ADRENÉRGICOS E AS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS
NO ANABOLISMO DE CÉLULAS MIOGÊNICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa – Câmpus Viçosa

T

T266a
2018

Teixeira, Susana Amaral, 1992-
Agonistas β -adrenérgicos e as vias de sinalização
envolvidas no anabolismo de células miogênicas / Susana
Amaral Teixeira. – Viçosa, MG, 2018.
vii, 45 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Simome Eliza Facioni Guimarães.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Genética animal. 2. Músculos. 3. Tecidos (Anatomia e
fisiologia. 4. Cultura de células. 5. Nutrição animal. 6.
Mioblastos. 7. Proteínas. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia . II. Título.

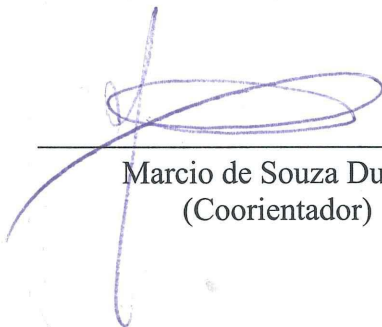
CDD 22. ed. 636.0821

SUSANA AMARAL TEIXEIRA

AGONISTAS β -ADRENÉRGICOS E AS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO ANABOLISMO DE CÉLULAS MIOGÊNICAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2018.



Marcio de Souza Duarte
(Coorientador)



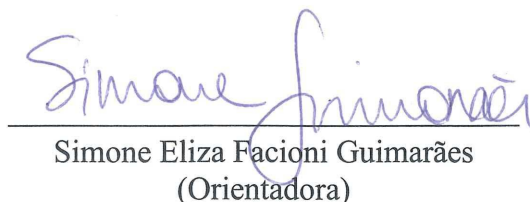
Carolina Filardi de Campos



Gabriel Cipriano Rocha



Emily Correna Carlo Reis



Simone Eliza Facioni Guimarães
(Orientadora)

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém”. (Dalai Lama).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todos os momentos de dificuldades, pois foram nestes momentos que me fortaleci e estive mais perto dEle. Agradeço ainda por ouvir minhas preces e colocar pessoas tão especiais em meu caminho:

Meus pais, Mozart e Pará, que mesmo com todas as dificuldades me proporcionaram estudo e dignidade;

Minha irmã Marina e meu cunhado Vinícius que sempre me incentivaram e acreditaram nos meus sonhos.

Meus sobrinhos Rodrigo e Beatriz que proporcionam tanta pureza e felicidades aos meus dias;

Meu noivo Marcos, que com muita dedicação e amor sempre me ouviu e incentivou meus projetos de vida, dando-me suporte emocional;

Minhas tias Çãozinha, Marise e Nívea que sempre me aconselharam e me apoiaram ao longo dessa longa caminhada de estudos, acreditando em meu potencial;

Minha querida Vovozinha, que mesmo agora junto a Deus, sinto que me abençoa e olha por mim;

Meus amigos Tadeu, Amanda e Jéssica que dividiram comigo os mais diversos momentos da carreira acadêmica;

Meus amigos e companheiros de trabalho do Labtec, em especial, Carol e Margareth, que me proporcionaram muito aprendizado ao longo desses anos e me incentivaram na busca pelas minhas conquistas;

Meus professores do DZO, em especial, à Simone e ao Márcio que aceitaram me orientar ao longo desses dois anos, contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

Enfim, agradeço a Deus por cada um dos que fizeram parte dessa caminhada, deixando algo de si comigo... Com certeza, vocês também contribuíram muito para que eu chegasse até aqui! Muito obrigada!!!

BIOGRAFIA

SUSANA AMARAL TEIXEIRA, filha de Mozart Teixeira Júnior e Maria Aparecida Amaral, nasceu em Ubá, Minas Gerais, em 28 de dezembro de 1992. Ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa em março de 2011 e graduou-se em Zootecnia em 29 de janeiro de 2016. Em março de 2016, iniciou o Mestrado em Zootecnia na mesma instituição, realizando suas pesquisas na área de Melhoramento Animal e submetendo-se à defesa em 23 de fevereiro de 2018.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 MIOGÊNESE	3
2.2 SINALIZAÇÃO β -ADRENÉRGICA	5
2.3 RACTOPAMINA	6
2.4 PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR AMP (AMPK)	9
2.5 PROTEÍNA ALVO DA RAPAMICINA EM MAMÍFEROS (mTOR)	11
2.6 CÉLULAS C2C12	13
2.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	14
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 2	23
1. INTRODUÇÃO	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1 EXTRAÇÃO E ABUNDÂNCIA DE PROTEÍNAS	27
2.2 EXPRESSÃO GÊNICA	28
2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
3. RESULTADOS	31
3.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	31
3.2 ABUNDÂNCIA DE PROTEÍNAS INDICADORAS DE ALTERAÇÃO DO <i>STATUS</i> ENERGÉTICO CELULAR	35
3.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	36
4. DISCUSSÃO	37
5. CONCLUSÃO	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

RESUMO

TEIXEIRA, Susana Amaral, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Agonistas β -adrenérgicos e as vias de sinalização envolvidas no anabolismo de células miogênicas.** Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Coorientador: Márcio de Souza Duarte.

O tecido muscular é um dos tecidos de maior importância ao nível de produção animal, tendo-se em vista o fornecimento de micronutrientes e proteínas para o consumo humano. A miogênese é o processo responsável pela formação e manutenção do tecido muscular, sendo influenciado por fatores genéticos e ambientais. Nesse sentido, pesquisas nas áreas de genética e nutrição têm contribuído de forma expressiva para a produção de animais mais eficientes e, conseqüentemente, produtivos. A utilização de agonistas β -adrenérgicos é uma importante estratégia neste processo, uma vez que os aditivos participam da repartição energética dos nutrientes dietéticos, contribuindo para o anabolismo do tecido muscular. As vias de sinalização intracelular AMPK (proteína quinase ativada por AMP) e mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) são sensíveis ao *status* energético e exercem grande influência sobre o desenvolvimento e crescimento muscular. No entanto, poucas pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de elucidar os mecanismos moleculares pelos quais os agonistas β -adrenérgicos atuam sobre o anabolismo do tecido muscular. As técnicas de cultivo celular se caracterizam como um importante modelo de estudos dos mecanismos moleculares envolvidos na sinalização intracelular para a manifestação de um fenótipo de interesse. No presente trabalho, a utilização do agonista β -adrenérgico ractopamina aumentou a viabilidade de mioblastos C2C12, regulando o *status* energético via AMPK, reduzindo, dessa forma, a apoptose das células. Portanto, sugere-se que o fenótipo muscular observado na presença de ractopamina deve-se, em partes, à atuação do aditivo sobre vias de sinalização intracelular que regulam a expressão de importantes genes envolvidos no anabolismo de células miogênicas.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Susana Amaral, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **β -adrenergic agonists and signaling pathways involved in myogenic cells anabolism.** Advisor: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-advisor: Márcio de Souza Duarte.

One of the most important tissues in animal production is muscle tissue, due to supply of micronutrients and proteins for human consumption. Myogenesis is the process involved in the development and maintenance of muscle tissue, being influenced by genetic and environmental factors. Therefore, researches in the areas of genetics and nutrition have contributed significantly to the production of more efficient and consequently, productive animals. The use of β -adrenergic agonists is an important strategy in this process, because the additives participate in energy distribution of dietary nutrients, contributing to anabolism of muscle tissue. AMPK (protein kinase AMP-activated) and mTOR (mammalian target protein of rapamycin) are important intracellular signaling pathways sensitive to energy status and exert great influence on development and growth of muscle tissue. However, few studies have been developed to elucidate the molecular mechanisms by which β -adrenergic agonists act on muscle tissue anabolism. Cell culture techniques are characterized as an important model for molecular mechanisms studies involved in the intracellular signaling to manifestation of the phenotype of interest. In the present study, the use of the β -adrenergic agonist ractopamine increased the viability of C2C12 myoblasts, regulating energetic status via AMPK, reducing, this way, cellular apoptosis. Therefore, these results suggest that the muscle phenotype observed in the presence of ractopamine is in part due to the action of the additive on intracellular signaling pathways that regulate the expression of important genes involved in myogenic anabolism.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

O músculo esquelético é considerado um dos tecidos mais dinâmicos e plásticos do organismo e representa, aproximadamente, 40% da massa corporal de um indivíduo [1]. Tratando-se da produção animal, este é um dos tecidos de maior valor econômico, uma vez que representa importante fonte de proteína e micronutrientes para o consumo humano [2].

Considerando-se o aumento da demanda populacional e do consumo de carne em quantidade e qualidade, as empresas de melhoramento animal têm focado na busca por animais mais eficientes, com maior deposição de tecido muscular, regulando indiretamente os processos que coordenam a miogênese.

A miogênese é o processo celular responsável pela origem e manutenção das fibras musculares esqueléticas [3]. O número e o tamanho das fibras determinam a massa muscular de um indivíduo [4] e são altamente influenciados por fatores genéticos e ambientais [4,5]. Nesse sentido, os aditivos β -adrenérgicos atuam como importantes ferramentas para manipulação do crescimento do tecido muscular [6] uma vez que influenciam a hiperplasia e a hipertrofia celular [7–9].

As vias de sinalização que regulam o crescimento celular são sensíveis ao *status* energético e modulam a expressão de genes e proteínas associados aos processos de sobrevivência, síntese proteica e proliferação celular [10–12]. Dentre essas vias, aquelas envolvendo a AMPK e a mTOR são potenciais responsáveis pelas alterações fenotípicas observadas na presença dos agonistas β -adrenérgicos, tendo-se em vista que os aditivos atuam sobre a repartição energética [13,14]. Entretanto, estudos que associem o efeito dos agonistas β -adrenérgicos às vias de sinalização sensíveis ao *status* energético celular, bem como à expressão de genes *downstream* envolvidos no crescimento, ainda são escassos na literatura.

A utilização das técnicas de estudo *in vitro* tem se destacado como importante ferramenta a fim de obter maior entendimento dos mecanismos moleculares, biológicos ou fisiológicos que coordenam a resposta observada no fenótipo de um organismo [8,15,16]. Além disso, devido à crescente preocupação com a utilização de animais para fins de experimentação, a técnica tem ganhado destaque em áreas como biologia molecular, genômica e proteômica [17]. Dentre as linhagens celulares mais utilizadas devido à sua alta

capacidade de proliferação e diferenciação *in vitro*, destaca-se a C2C12 que são mioblastos provenientes de camundongos [18].

Nesse sentido, no presente trabalho, objetivou-se avaliar e entender os principais mecanismos moleculares envolvidos na repartição energética desencadeados pela exposição de mioblastos C2C12 ao agonista β -adrenérgico ractopamina.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MIOGÊNESE

A miogênese é o complexo processo biológico de formação do tecido muscular que envolve a determinação de células-tronco pluripotentes mesodérmicas à linhagem miogênica e sua posterior diferenciação em miócitos funcionais [19], sendo iniciado no embrião como resultado da sinalização de tecidos vizinhos que especificam o destino das células para a linhagem miogênica [20]. O processo miogênico é coordenado de modo que após o estabelecimento de um *pool* ideal de células, os sinais celulares induzem a saída dos miócitos do ciclo celular, dando início ao processo de diferenciação [4], mediante a expressão coordenada de milhares de genes cujos mecanismos moleculares são conservados em várias espécies [21].

Em mamíferos, a miogênese ocorre em etapas [22]. Inicialmente, as células mesodérmicas pluripotentes (somitos) se diferenciam em mioblastos. Os mioblastos são células de linhagem miogênica, mononucleados e de alta capacidade proliferativa, sendo esta uma importante característica para o estabelecimento do número ótimo de células musculares [4]. Posteriormente, há proliferação e migração de mioblastos que se fundem para formar os miotubos multinucleados e, finalmente, os miócitos maduros e funcionais [4]. Os eventos básicos da miogênese estão sumarizados na Figura 1.

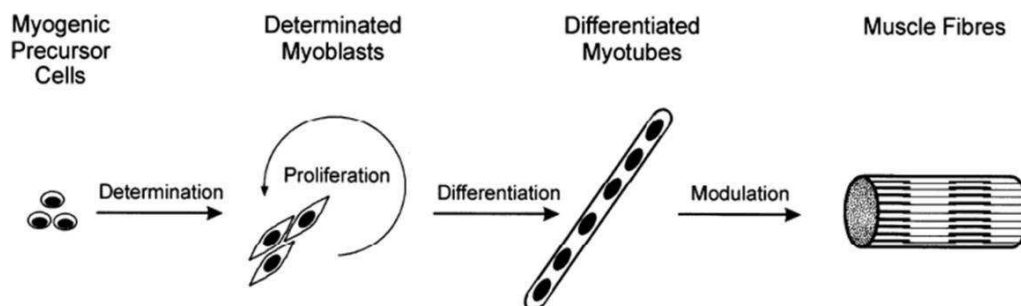


Figura 1: Eventos básicos da miogênese. (Fonte: Rehfeldt et al., 2000).

Por serem células longas e estreitas, as células musculares são comumente denominadas de fibras musculares. A formação das fibras musculares ocorre a partir das ondas primária e secundária; cada onda consiste na proliferação e na fusão dos mioblastos para formar novas fibras musculares [4,22]. Enquanto as fibras primárias são formadas de

novo por meio da fusão dos mioblastos, as fibras secundárias utilizam as fibras primárias como molde em uma segunda onda de diferenciação [22].

Existe uma população de células que não se diferenciam em células musculares e se localizam abaixo da membrana basal das fibras musculares, conhecidas como células-satélite [20]. As células-satélite são mononucleadas e mitoticamente ativas durante o processo de hipertrofia (aumento do tamanho das células) [12]. Essas células atuam em diferentes eventos durante a miogênese, como crescimento e regeneração das fibras musculares, manutenção, renovação e adaptação das células miogênicas, além de participarem do crescimento pós-natal a partir da doação de novos mionúcleos às fibras musculares [4,23].

Durante o desenvolvimento pré-natal, o crescimento muscular se dá por proliferação dos mioblastos, resultando em aumento do número de células, processo conhecido como hiperplasia [24]. Diferentemente, no período pós-natal, as células musculares perdem sua capacidade proliferativa e assim, o crescimento ocorrerá, em sua maioria, por hipertrofia, ou seja, aumento do diâmetro das células [1]. A hipertrofia ocorre primeiramente no sentido longitudinal da fibra pelo aumento do número de sarcômeros e, posteriormente, pelo aumento do diâmetro celular a partir da deposição de proteínas miofibrilares [6].

Embora a hiperplasia das células musculares seja um evento exclusivamente pré-natal [4], sua ocorrência é responsável por determinar o potencial de crescimento e a capacidade de desenvolvimento do tecido muscular no período pós-natal [24]. Dessa forma, a seleção de animais para crescimento muscular resulta em aumento nas taxas de proliferação dos mioblastos, aumentando o número de mionúcleos e potencializando a síntese proteica [4].

A massa muscular depende do número e do tamanho das fibras musculares [2], sendo passível da influência de fatores genéticos e ambientais [4,24]. Nesse sentido, importantes avanços têm sido observados na área de genética e nutrição animal a fim de atender à crescente demanda por carne [25].

Em um sistema de produção em que se prioriza a eficiência de produção de carne, os esforços concentram-se no aumento da deposição de tecido magro em detrimento da deposição de tecido adiposo [25]. Assim, diferentes estratégias podem ser utilizadas para potencializar o aumento da massa muscular na produção animal, dentre elas, a utilização de agonistas β -adrenérgicos [9,14,25,26].

2.2 SINALIZAÇÃO β -ADRENÉRGICA

Os β -adrenérgicos endógenos são as catecolaminas (epinefrina e noraepinefrina), caracterizadas como os principais hormônios do estresse [13]. Os receptores β -adrenérgicos apresentam diferentes subtipos (β AR1, β AR2 e β AR3), cuja proporção nos tecidos corporais pode variar entre as espécies [13,27].

A sinalização β -adrenérgica se inicia a partir da sensibilização dos receptores β -adrenérgicos que estão embebidos na membrana plasmática da maioria das células dos mamíferos [27], desencadeando ações fisiológicas e metabólicas sobre o controle da frequência sanguínea e cardíaca, da tensão muscular, contrações uterinas e degradação das reservas energéticas [28].

Os receptores β -adrenérgicos são acoplados às proteínas Gs e constituem o maior grupo de receptores de superfície de membrana celular em mamíferos [29]. As proteínas Gs são compostas pelas subunidades α , β e γ , sendo a subunidade α responsável por ativar a adenilato ciclase (AC), dando início à cascata de sinalização β -adrenérgica. Após ser ativada, a AC converte trifosfato de adenosina (ATP) em adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que atua como uma molécula de sinalização intracelular, conhecido como segundo mensageiro intracelular. O aumento dos níveis de AMPc ativam a proteína quinase A (PKA), que por sua vez, atua sobre a fosforilação de proteínas e enzimas associadas ao metabolismo celular a partir da ativação do fator de transcrição CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta AMPc) [25,28]. Dessa forma, os β -adrenérgicos regulam a expressão de muitas enzimas e fatores importantes na regulação metabólica [25].

O mecanismo de ação desencadeado pela interação dos β -adrenérgicos com os receptores de membrana pode ser visualizado na Figura 1.

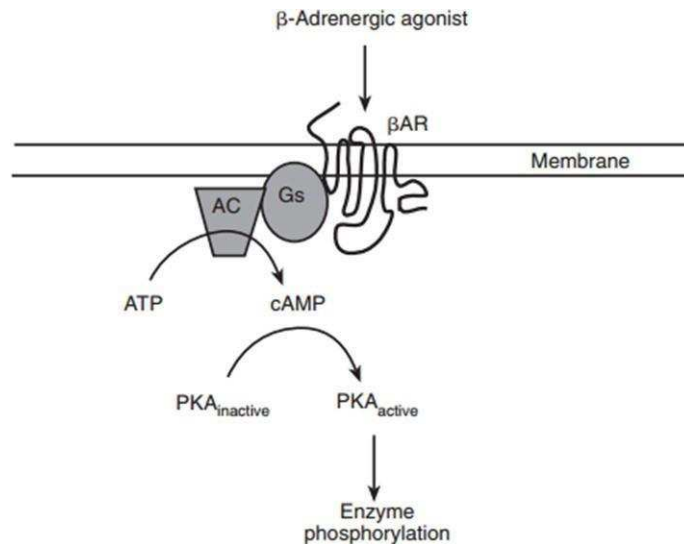


Figura 1: Mecanismo de transdução de sinais a partir dos receptores β -adrenérgicos. (Fonte: Moody, 2000).

Embora tradicionalmente usados na medicina humana em pacientes broncoasmáticos, os β -adrenérgicos desencadeiam efeitos positivos sobre o crescimento muscular a partir da repartição energética quando administrados aos animais de produção [25,29]. Dessa forma, estes aditivos são denominados agentes modificadores de carcaça ou agentes de partição energética [13].

Os β -adrenérgicos sintéticos mais estudados são o cimaterol, o clenbuterol, a ractopamina, o salbutamol e o zilpaterol [14]. Em geral, a resposta celular à presença desses β -adrenérgicos sobre a produção animal resulta em aumento da taxa de ganho de peso, melhora da eficiência na utilização dos alimentos e aumento da porcentagem de carne magra na carcaça [14,27].

2.3 RACTOPAMINA

Dentre os agonistas β -adrenérgicos utilizados na produção animal destaca-se o cloridrato de ractopamina, também conhecido como ractopamina, cuja principal característica é promover o efeito anabólico do tecido muscular animal [29–31] a partir da repartição de nutrientes do tecido adiposo em direção ao aumento da deposição de tecido muscular *in vivo* [26,27]. O aditivo foi o primeiro agonista β -adrenérgico licenciado para uso na produção de suínos em 1999 [25].

A ractopamina pertence à família das fenetanolaminas e apresenta características similares aos hormônios β -adrenérgicos epinefrina e norepinefrina [26], entretanto, a mesma é considerada um agonista β -adrenérgico, devido ao fato de ser um composto sintético que se liga aos receptores orgânicos desencadeando ondas de sinalização intracelular que mimetizam e potencializam a atividade de um mediador biológico natural [28].

Comercialmente, os isômeros RR, SS, RS e SR da ractopamina estão disponíveis [8] e apresentam diferentes níveis de sensibilidade aos subtipos dos receptores β -adrenérgicos, sendo o isômero RR o mais sensível ao subtipo 1 e os demais ao subtipo 2 [13]. Entretanto, a ausência de estudos conclusivos sobre os malefícios do consumo da carne provenientes de animais alimentados com ractopamina à saúde humana, levou países como União Europeia, Rússia e China a proibirem o uso do aditivo em seus rebanhos, bem como o comércio com os países que a utilizam [32].

O mecanismo de ação da ractopamina é semelhante ao dos β -adrenérgicos endógenos, pois envolve a liberação de estímulos a partir de receptores especializados, conhecidos como β AR1 e β AR2 (receptor β adrenérgico 1 e 2, respectivamente) expressos tanto nas células do músculo esquelético quanto nas células adiposas [28]. Esses receptores desencadeiam ondas de sinalização celular através do AMPc. Entretanto, a cascata de sinalização celular decorrente da exposição à ractopamina, bem como aos demais agonistas β -adrenérgicos, é sensível à seletividade do aditivo ao receptor, sendo a ractopamina mais seletiva aos β AR1, potencializando o aumento da massa muscular em suínos em relação aos animais ruminantes [14].

Além disso, outros fatores como o tempo de administração, a idade, a genética e o sexo do animal podem alterar a resposta celular à presença do aditivo [13,28]. A exposição crônica ao aditivo pode resultar em dessensibilização ou *downregulation* dos receptores β adrenérgicos [28]. Este processo é decorrente da fosforilação dos receptores β -adrenérgicos pelas proteínas quinases, como a própria PKA, sendo posteriormente internalizados pela membrana celular reduzindo as respostas à sinalização [14,26].

A exposição dos adipócitos à ractopamina resulta em aumento da hidrólise das reservas lipídicas por ativação da enzima lipase hormônio sensível (LHS) [28,30,33] em decorrência da ativação da PKA. Simultaneamente, a ativação da PKA resulta em fosforilação da LHS bem como das proteínas pirilipinas que circundam a gotícula lipídica.

Em conjunto, esses processos facilitam o acesso da LHS à gotícula lipídica promovendo hidrólise dos triglicerídeos [34]. Dessa forma, a ractopamina induz a redução da hipertrofia dos adipócitos, levando a uma menor deposição de gordura [28]. Além disso, o aditivo pode reduzir a adipogênese ao reduzir a proliferação das células adiposas e a sensibilidade à insulina, bem como a atividade das enzimas lipogênicas [14].

No tecido muscular, o efeito da ractopamina está associado, principalmente, à alteração da massa muscular, a partir da repartição energética do tecido adiposo em direção ao anabolismo do tecido muscular [14], potencializando a eficiência alimentar dos animais de produção. Em geral, a melhora da eficiência alimentar é acompanhada do aumento da massa muscular e redução da deposição de tecido adiposo [25]. Suínos em fase de terminação suplementados com o aditivo durante 28 dias antes do abate apresentaram melhora da conversão alimentar em 4%, aumento na área de olho de lombo em 7% e redução em 12% na relação gordura: carne, resultando em maior rendimento de carcaça [35].

A suplementação diária da dieta de suínos em fase de terminação, durante 21 dias antes do abate, até o nível de 20 ppm (partes por milhão) de ractopamina parece aumentar o diâmetro das fibras musculares [30]. Entretanto, tendo-se em vista que o crescimento muscular pós-natal se dá por hipertrofia [36], espera-se que o efeito da ractopamina sobre o aumento da massa muscular ocorra por alteração no balanço entre síntese e degradação das proteínas musculares [25]. As calpaínas são proteases cálcio-dependente, associadas à redução da massa muscular por degradação de proteínas miofibrilares [14,37]

Além de atuar sobre a hipertrofia de células miogênicas, pesquisas *in vitro* têm demonstrado que a ractopamina afeta a hiperplasia de mioblastos [8,38]. A exposição de mioblastos da linhagem C2C12 à ractopamina resultou em um aumento de, aproximadamente, 30% na proliferação celular e na concentração de proteína e DNA [8].

Sabe-se que os processos celulares que culminam em crescimento e desenvolvimento muscular envolvem importantes vias de sinalização intracelular que são dependentes do *status* energético [39] e que a ractopamina atua sobre a repartição de nutrientes provocando aumento anabolismo das células miogênicas [25]. Dentre as vias de sinalização celular afetadas pela presença de β -adrenérgicos, aquelas envolvendo a AMPK (proteína quinase ativada por AMP) e a mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) são potenciais responsáveis pela alteração fenotípica causada pela ractopamina. Entretanto, o

entendimento do mecanismo molecular pelo qual a ractopamina atua sobre as vias de sinalização envolvidas no metabolismo energético celular resultando em crescimento das células miogênicas ainda é escasso na literatura.

2.4 PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR AMP (AMPK)

A AMPK é uma treonina/serina quinase filogeneticamente conservada [40] que atua como o mais importante sensor molecular do nível energético em células de organismos eucariotos [41]. Dessa forma, pequenas variações na relação AMP: ATP são capazes de ativar a proteína por fosforilação [42].

Estruturalmente, a AMPK consiste em uma subunidade catalítica (α) e duas subunidades regulatórias (β e γ), sendo a subunidade γ sensível às relações ADP: ATP celulares [43]. As subunidades apresentam diferentes isoformas que são diferencialmente expressas nos tecidos. A isoforma $\alpha 1$ é predominantemente expressa no fígado e no tecido adiposo, enquanto que a subunidade $\alpha 2$ é predominantemente expressa no cérebro, coração e músculo esquelético [40].

A ativação da AMPK é desencadeada por fosforilação do resíduo de Treonina-172 (Thr 172) na subunidade α por ação das proteínas CaMKK β (proteína quinase B dependente de cálcio/calmodulina), LKB1 (quinase supressora de tumor hepático B1) e TAK1 (fator transformador de crescimento β ativado por proteína quinase-1) que se localizam *upstream* à AMPK [40,44].

As células realizam um rigoroso controle das reservas energéticas de forma que o consumo de energia seja condizente com a disponibilidade e a capacidade das mesmas em produzirem ATP [43]. A ativação da AMPK estimula o catabolismo celular enquanto inibe vias anabólicas, a fim de restaurar e regular o *status* energético das células [40]. Em condições fisiológicas normais, quando a relação ATP: ADP ou ATP: AMP celular é maior, a AMPK não é fosforilada, permitindo a restauração das reservas energéticas celulares. Assim, a AMPK ajusta os mecanismos celulares em função da demanda de energia das células [40,44]. O esquema de ativação da AMPK e seus efeitos sobre os diferentes tecidos podem ser visualizados na Figura 2.

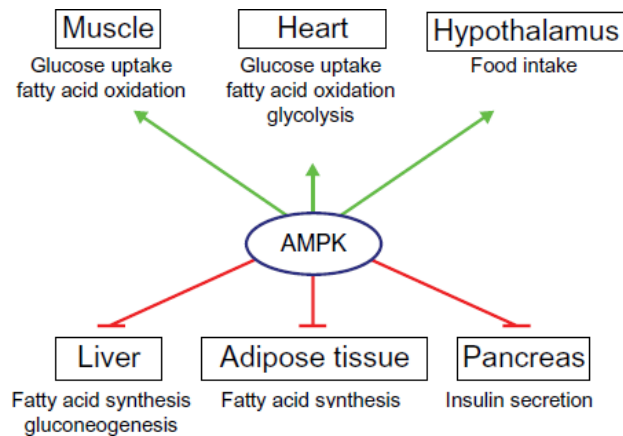


Figura 2: Funções da AMPK sobre o metabolismo energético. (Fonte: adaptado de Coughlan, 2014).

Estudos envolvendo a ativação da AMPK têm utilizado agentes capazes de regular o estado de fosforilação da proteína, incluindo fármacos, compostos naturais e hormônios [40]. O AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranosid) se destaca como o fármaco mais antigo associado à fosforilação da AMPK [40]. Este componente promove o aumento da concentração intracelular de ZMP (5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido), mimetizando os níveis de AMP (adenosina monofosfato) celular [45]. A maior abundância de AMP celular se liga à subunidade γ da AMPK resultando em aumento da fosforilação do Thr-172 e ativação da AMPK [40].

Alterações metabólicas prolongadas podem induzir a ação da AMPK sobre o metabolismo celular regulando a transcrição gênica [43]. A ativação da AMPK em cultura de células miogênicas leva à expressão de fatores associados à regulação do crescimento e ao desenvolvimento muscular, ao transporte de glicose, bem como à regulação de genes *downstream* à mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) [46–49]. Além disso, a ativação da AMPK também está associada à biogênese mitocondrial [46,50] e à expressão de enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa [3,51]. Dentre essas enzimas, a ATP sintase subunidade mitocondrial tem sido utilizada como marcador do evento de síntese de ATP celular [52], constituindo um importante alvo da ação da AMPK.

O nível do segundo mensageiro intracelular AMPc também atua como um importante regulador da atividade da AMPK em cultura de células [53]. A adição do agonista β -adrenérgico isoproterenol em culturas de adipócitos resultou na fosforilação da AMPK, potencializando a lipólise *in vitro* [33]. Dessa forma, os mecanismos moleculares

envolvendo a sinalização β -adrenérgica podem estar associados à regulação da atividade da AMPK sobre a energética celular.

2.5 PROTEÍNA ALVO DA RAPAMICINA EM MAMÍFEROS (mTOR)

A mTOR emergiu como grande efetora do crescimento e da proliferação celular por meio do controle da síntese proteica [54,55]. A ativação da mTOR resulta em aumento do crescimento celular e entrada das células no ciclo celular, enquanto a hiperativação da via está associada à formação de células cancerosas [56]. As proteínas p53 e KI-67 têm sido utilizadas como importantes variáveis respostas à hiperativação da mTOR [57].

Estruturalmente, a proteína mTOR é composta por duas subunidades que compreendem distintos complexos: complexo mTOR 1 (mTORC1) e complexo mTOR 2 (mTORC2). O complexo 1 é composto pelas subunidades mTOR, Raptor e mLST8, caracterizado pela sensibilidade à rapamicina (componente que bloqueia a atividade da proteína mTOR) [56], bem como por sua ação sobre o anabolismo celular, incluindo as sínteses proteica, lipídica e de ácidos nucleicos devido a sensibilidade aos níveis de aminoácidos, oxigênio, energia e fatores de crescimento [58]. O mTORC2 apresenta as mesmas subunidades do mTORC1, à exceção do Raptor que no mTORC2 é substituído pelo Rictor, insensível à rapamicina [59]. De forma contrária às funções do mTORC1 sobre o anabolismo celular, o mTORC2 parece estar mais associado à organização do citoesqueleto e à polarização celular [56,60].

Dentre as funções da mTOR sobre o anabolismo celular, destaca-se o controle da síntese proteica por ativação do mTORC1 [57,58,61]. Os substratos do mTORC1 envolvidos no controle da síntese proteica são a quinase ribossomal S6K (S6K1 e 2) e o fator de iniciação de tradução eucarioto (eIF4E) ligante à proteína 1 (4E-BP1) [62].

A via mTOR tem sido associada à diversos processos metabólicos, tais como a proliferação celular, a síntese proteica celular e a biogênese de ribossomos [63] por meio da sensibilidade do complexo 1 à diferentes fatores externos [58]. A influência dos fatores externos sobre a sinalização do mTORC1 nos diferentes processos celulares pode ser visualizada na Figura 3.

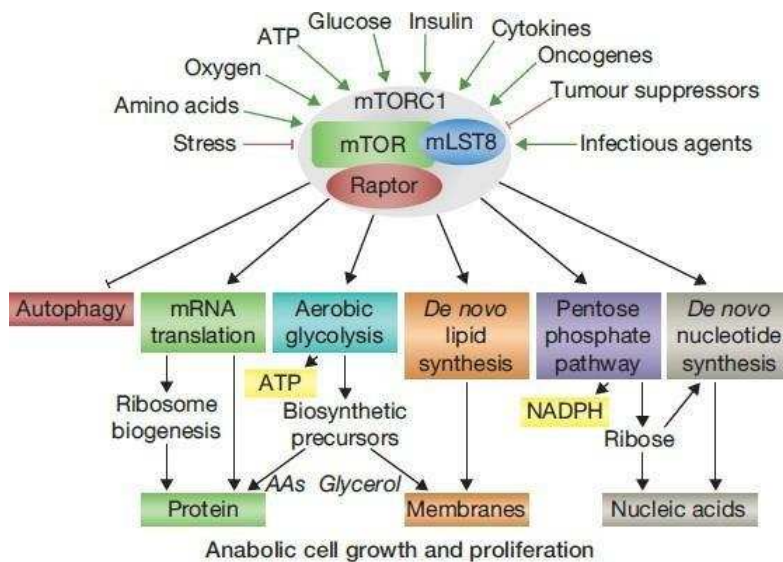


Figura 3: Sinalização do mTORC1 sobre o anabolismo celular a partir de diferentes condições de crescimento. (Fonte: Dibble et al., (2013)).

No tecido muscular, a mTOR tem sido associada, principalmente, ao aumento da massa muscular por hipertrofia [7,54,64], sendo ativada pela presença de insulina e fatores de crescimento sensíveis aos receptores do tipo tirosina-quinase (RTKs) ou acoplados à proteína G (GPCRs) na superfície celular [58]. A ractopamina é um agonista β -adrenérgico que desencadeia ondas de sinalização celular por meio dos receptores acoplados à proteína G, dessa forma, a suplementação de suínos em fase de terminação com o agonista β -adrenérgico provocou estímulo à síntese proteica por ativação da mTOR [7].

As atividades metabólicas celulares são reguladas pela disponibilidade energética, a partir da sinalização entre as redes bioquímicas celulares sensíveis à presença de nutrientes e à capacidade das mesmas em transmitir essas informações para reguladores metabólicos e enzimas [58]. A ativação do maior sensor do nível energético de células de organismos eucariotos, a via AMPK, provoca inibição da atividade do mTORC1 sobre diversos processos anabólicos [56,65]. Isso sugere uma importante conexão entre as vias AMPK e mTOR sobre o controle de diferentes eventos e processos celulares. A Figura 4 sumariza a relação entre as vias mTOR e AMPK.

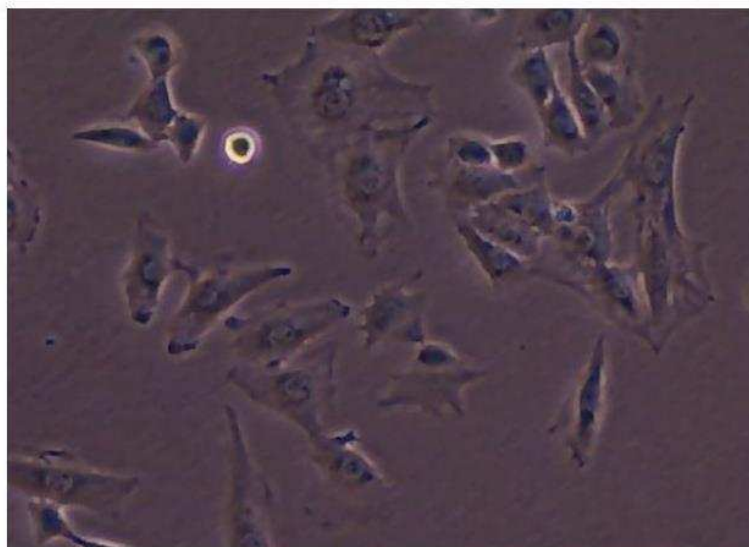


Figura 5: Morfologia das células C2C12 *in vitro*. (Fonte: Arquivo pessoal).

A crescente utilização dos mioblastos C2C12 em estudos *in vitro*, se deve, em grande parte, ao fato dos mesmos exibirem a maioria das características dos mioblastos normais e diferenciarem-se em cultura, propiciando um excelente modelo para o estudo dos processos de proliferação e diferenciação das células [19].

Em geral, estudos que utilizam cultivo celular visam maior entendimento dos mecanismos moleculares, biológicos e fisiológicos, que coordenam a resposta observada no fenótipo de um organismo [8,15,17], uma vez que os estudos *in vitro* possibilitam a remoção de variáveis que podem alterar o metabolismo celular, como os efeitos do fluxo sanguíneo e de nutrientes [8].

Nesse sentido, importantes pesquisas envolvendo a utilização de agonistas β -adrenérgicos têm utilizado as técnicas *in vitro* a fim de estudar os efeitos do aditivo sobre a sinalização desencadeada sobre os tecidos muscular e adiposo [8,9,33]. Entretanto, tendo-se em vista as inúmeras vantagens da utilização de estudos *in vitro* sobre os mecanismos de sinalização celular, os dados provenientes dos mesmos precisam ser reprodutíveis e confiáveis [16].

2.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A utilização de aditivos em cultura de células requer o uso de ensaios de viabilidade celular, a fim de se obter resultados confiáveis e reprodutíveis [16]. Existe uma grande variedade de componentes utilizados para detecção de células viáveis, tais como exposição

das células ao corante *trypan blue*, estimação do nível de lactato desidrogenase (LDH), redução do tetrazólio e ensaios de atividade de proteases [66,67]. Entretanto, devido à simplicidade e praticidade de condução dos ensaios, aqueles baseados na redução dos sais de tetrazólio têm sido os mais utilizados [66].

Dentre os componentes comumente utilizados nos ensaios de redução do tetrazólio destaca-se o MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]), MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H tetrazolium), XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida) e WST (sais de tetrazolium solúveis em água). Esses componentes se caracterizam pela carga química do componente que garante a velocidade de penetração do mesmo através da membrana plasmática celular. O MTT é positivamente carregado, sendo rapidamente metabolizado nas mitocôndrias de células viáveis de organismos eucariotos [16]. O ensaio é considerado versátil e quantitativo, utilizado tanto para ensaios de citotoxicidade quanto para análise de proliferação celular [66].

O ensaio do MTT consiste na adição do componente MTT de coloração amarela às culturas de células. Depois de metabolizado pelas células viáveis, observa-se a formação de cristais de formazan, de coloração roxa púrpura, que podem ser solubilizados e mensurados por espectrofotometria. A quantidade de formazan mensurada se relaciona diretamente à quantidade de células viáveis [16].

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] W.R. Frontera, J. Ochala, Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function, *Calcif. Tissue Int.* 96 (2014) 183–195. doi:10.1007/s00223-014-9915-y.
- [2] C.A. Maltin, M.I. Delday, K.D. Sinclair, J. Steven, A.A. Sneddon, Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle, *Reproduction.* 122 (2001) 359–374. doi:10.1530/reprod/122.3.359.
- [3] C.S. Kraft, C.M.R. Lemoine, C.N. Lyons, D. Michaud, C.R. Mueller, C.D. Moyes, C.D.M. Control, A.J. *Physiol.*, C. *Physiol.*, C. C, Control of mitochondrial biogenesis during myogenesis, (2007) 1119–1127. doi:10.1152/ajpcell.00463.2005.
- [4] C. Rehfeldt, I. Fiedler, G. Dietl, K. Ender, Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection, *Livest. Prod. Sci.* 66 (2000) 177–188. doi:10.1016/S0301-6226(00)00225-6.
- [5] R. Xiang, M. Ghanipour-Samami, W.H. Johns, T. Eindorf, D.L. Rutley, Z.A. Kruk, C.J. Fitzsimmons, D.A. Thomsen, C.T. Roberts, B.M. Burns, G.I. Anderson, P.L. Greenwood, S. Hiendleder, Maternal and Paternal Genomes Differentially Affect Myofibre Characteristics and Muscle Weights of Bovine Fetuses at Midgestation, *PLoS One.* 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0053402.
- [6] A.M. Bridi, C.A. Silva, E.H. Hioshi, Manipulação do número e tipo de fibra muscular e a produção de carne suína, 1 (2015). doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [7] M.S.S. Ferreira, A.C. Alves, L.C.J. Porto, A.P. Schinckel, Z.J. Rambo, V.S. Cantarelli, M.G. Zangeronimo, R. V Sousa, Ractopamine with dietary lysine concentrations above basal requirements of finishing barrows improves growth performance, carcass traits and modifies the mTOR signalling pathway, (2016).
- [8] N.W. Shappell, V.J. Feil, D.J. Smith, G.L. Larsen, D.C. McFarland, Response of C2C12 mouse and turkey skeletal muscle cells to the beta-adrenergic agonist ractopamine., *J. Anim. Sci.* 78 (2000) 699–708.
- [9] O. Adeola, R.O. Ball, L.G. Young, Porcine skeletal muscle myofibrillar protein synthesis is stimulated by ractopamine., *J. Nutr.* 122 (1992) 488–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1375287>.
- [10] D.J. Glass, Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy, *Nat Cell Biol.* 5 (2003) 87–90. doi:10.1038/ncb0203-87 ncb0203-87 [pii].

- [11] M. Laplante, Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance, 125773 (2013) 1713–1719. doi:10.1242/jcs.125773.
- [12] K.C. Chang, Key signalling factors and pathways in the molecular determination of skeletal muscle phenotype., *Animal*. 1 (2007) 681–98. doi:10.1017/S1751731107702070.
- [13] S.E. Mills, Biological basis of the ractopamine response, *Receptor*. (2000) 28–32.
- [14] D.E. Moody, D.L. Hancock, D.B. Anderson, Phenethanolamine Repartitioning Agents, in: J.P.F. D’Mello (Ed.), *Farm Anim. Metab. Nutr.*, Londres, 2000: p. 65.
- [15] P.T. Anderson, W.G. Helferich, L.C. Parkhill, R.A. Merkel, W.G. Bergen, Ractopamine increases total and myofibrillar protein synthesis in cultured rat myotubes., *J. Nutr.* 120 (1990) 1677–83. <http://europepmc.org/abstract/med/1979808>.
- [16] T.L. Riss, R.A. Moravec, A.L. Niles, H.A. Benink, T.J. Worzella, L. Minor, Cell viability assays, (2016). doi:10.1007/978-1-61779-108-6.
- [17] A.E. Amorim, A.C.R. Guimarães, *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*, 2014. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [18] P.P. Artilheiro, J.L.P. Barbosa, N.H.C. Souza, M.T. da Silva, S.K. Bussadori, K.P.S. Ferandes, R.A.M. Ferrari, Análise da proliferação e morfologia de mioblastos C2C12 durante o processo de diferenciação, *Rev. Ciências Médicas E Biológicas*. 11 (2010) 275–278. <http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/6136>.
- [19] T. Braun, H.H. Arnold, The four human muscle regulatory helix-loop-helix proteins Myf3-Myf6 exhibit similar hetero-dimerization and DNA binding properties, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5645–5651. doi:10.1093/nar/19.20.5645.
- [20] M. Buckingham, Skeletal muscle formation in vertebrates, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11 (2001) 440–448. doi:10.1016/S0959-437X(00)00215-X.
- [21] B.P. Sollero, S.E.F. Guimarães, V.D. Rilington, R.J. Tempelman, N.E. Raney, J.P. Steibel, J.D. Guimarães, P.S. Lopes, M.S. Lopes, C.W. Ernst, Transcriptional profiling during foetal skeletal muscle development of Piau and Yorkshire-Landrace cross-bred pigs, *Anim. Genet.* 42 (2011) 600–612. doi:10.1111/j.1365-2052.2011.02186.x.
- [22] M.F.W. Te Pas, I. Hulsegge, A. Coster, M.H. Pool, H.H. Heuven, L.L.G. Janss,

- Biochemical pathways analysis of microarray results: regulation of myogenesis in pigs., *BMC Dev. Biol.* 7 (2007) 66. doi:10.1186/1471-213X-7-66.
- [23] X. Shi, D.J. Garry, Muscle stem cells in development, regeneration, and disease, *Genes Dev.* 20 (2006) 1692–1708. doi:10.1101/gad.1419406.
- [24] A. Tasleem Jan, E. Ju Lee, S. Ahmad, I. Choi, Meeting the meat: delineating the molecular machinery of muscle development, *J. Anim. Sci. Technol.* (2016) 1–10. doi:10.1186/s40781-016-0100-x.
- [25] T. Parr, M.H.D. Mareko, K.J.P. Ryan, K.M. Hemmings, D.M. Brown, J.M. Brameld, The impact of growth promoters on muscle growth and the potential consequences for meat quality, *MESC.* (2016). doi:10.1016/j.meatsci.2016.04.022.
- [26] V.V. de Almeida, A.J.C. Nuñez, V.S. Miyada, Ractopamine as a metabolic modifier feed additive for finishing pigs: A review, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 55 (2012) 445–456. doi:10.1590/S1516-89132012000300016.
- [27] H.J. Mersmann, Overview of the Effects of β -Adrenergic Receptor Agonists on Animal Growth Including Mechanisms of Action, *J. Anim. Sci.* 76 (1998) 160–172.
- [28] H.J. Mersmann, Beta-Adrenergic receptor modulation of adipocyte metabolism and growth, *J. Anim. Sci.* 80 (2002) E24–29. http://jas.fass.org/cgi/content/abstract/80/E-Suppl_1/E24.
- [29] G.S. Lynch, J.G. Ryall, Role of β -Adrenoceptor Signaling in Skeletal Muscle: Implications for Muscle Wasting and Disease, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 729–767. doi:10.1152/physrev.00028.2007.
- [30] P.S. Agostini, C.A. Silva, A.M. Bridi, R.A.M. Abrami, G.D. Pacheco, A.P. Lozano, M.S. Ywazaki, D.B. Dalto, D.F. Gavioli, E.R. Oliveira, E.G. Bonafé, N.E. Souza, J. V. Visentainer, Efeito da ractopamina na performance e na fisiologia do suíno, *Arch. Zootec.* 60 (2011) 659–670. doi:10.4321/S0004-05922011000300054.
- [31] C.S. Marcolla, D.M. Holanda, S. V Ferreira, G.C. Rocha, Chromium, CLA, and ractopamine for finishing pigs 1, (2017). doi:10.2527/jas2017.1753.
- [32] T.J. Centner, J.C. Alvey, A.M. Stelzleni, Beta agonists in livestock feed: Status, health concerns, and international trade, *J. Anim. Sci.* 92 (2014) 4234–4240. doi:10.2527/jas2014-7932.
- [33] W. Yin, J.B. Mu, M. J., Role of AMP-activated Protein Kinase in Cyclic AMP-dependent Lipolysis In 3T3-L1 Adipocytes*, *J. Biol. Chem.* (2003).

- [34] R.E. Duncan, M. Ahmadian, K. Jaworski, E. Sarkadi-Nagy, H.S. Sul, Regulation of Lipolysis in Adipocytes, *Annu. Rev. Nutr.* 27 (2007) 79–101. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734.
- [35] V.V. de Almeida, B. Berenchein, L.B. Costa, M.L.P. Tse, D.B. Braz, V.S. Miyada, Ractopamina, cromo-metionina e suas combinações como aditivos modificadores do metabolismo de suínos em crescimento e terminação, *Rev. Bras. Zootec.* 39 (2010) 1969–1977. doi:10.1590/S1516-35982010000900015.
- [36] W.R. Frontera, J. Ochala, Skeletal muscle: a brief review of structure and function, *Calcif. Tissue Int.* 96 (2015) 183–195. doi:10.1007/s00223-014-9915-y.
- [37] K. Nakashima, Y. Yakabe, AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (2007) 1650–1656. doi:10.1271/bbb.70057.
- [38] D.R. Cook, M.E. Doumit, R.A. Merkel, Ractopamine, cAMP and Forskolin enhance the mitogenic activity of platelet-derived growth factor- BB on culture porcine satellite cells, *BAM.* 5 (1995) 57–64.
- [39] S.L. McGee, M. Hargreaves, AMPK-mediated regulation of transcription in skeletal muscle., *Clin. Sci. (Lond).* 118 (2010) 507–18. doi:10.1042/CS20090533.
- [40] K.A. Coughlan, R.J. Valentine, N.B. Ruderman, A.K. Saha, AMPK activation: A therapeutic target for type 2 diabetes?, *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 7 (2014) 241–253. doi:10.2147/DMSO.S43731.
- [41] S.S. Jäger, C.C. Handschin, J.J. St-Pierre, B.M.B.M. Spiegelman, AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha., *Pnas.* 104 (2007) 12017–12022. doi:10.1073/pnas.0705070104.
- [42] D.G. Hardie, AMP-activated protein kinase-an energy sensor that regulates all aspects of cell function, *Genes Dev.* 25 (2011) 1895–1908. doi:10.1101/gad.17420111.
- [43] S. Herzig, R.J. Shaw, AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2017). doi:10.1038/nrm.2017.95.
- [44] D. Carling, M.J. Sanders, a Woods, The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases., *Int. J. Obes. (Lond).* 32 Suppl 4 (2008) S55–S59. doi:10.1038/ijo.2008.124.

- [45] J.M. Corton, J.G. Gillespie, S. a Hawley, D.G. Hardie, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?, *Eur. J. Biochem.* 229 (1995) 558–565. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.0558k.x.
- [46] J.-Y.P. W J Lee, Mina Kim, Hye-Sun Park, Hyoun Sik Kin, Min Jae Jeon, Ki Sook Oh, Eun Hee Koh, Jong Chul Won, Min-Seon Kim, Goo Taeg Oh, Michung Yoon, Ki-Up Lee, AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR α and PGC-1, *BBRC.* (2005).
- [47] A.K. Das, Q. Yang, X. Fu, J. Liang, M.S. Duarte, M. Zhu, G.D. Trobridge, M. Du, *Biochemical and Biophysical Research Communications* AMP-activated protein kinase stimulates myostatin expression in C2C12 cells, 427 (2012) 36–40.
- [48] L.F. Michael, Z. Wu, R.B. Cheatham, P. Puigserver, G. Adelmant, J.J. Lehman, D.P. Kelly, B.M. Spiegelman, Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 3820–3825. doi:10.1073/pnas.061035098.
- [49] D.R. Bolster, S.J. Crozier, S.R. Kimball, L.S. Jefferson, AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 23977–23980. doi:10.1074/jbc.C200171200.
- [50] C. Cantó, J. Auwerx, PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure, *Curr. Opin. Lipidol.* 20 (2009) 98–105. doi:10.1097/MOL.0b013e328328d0a4.
- [51] E. Barbieri, M. Battistelli, L. Casadei, L. Vallorani, G. Piccoli, M. Guescini, A.M. Gioacchini, E. Polidori, P. Ceccaroli, L. Stocchi, V. Stocchi, E. Falcieri, *Morphofunctional and Biochemical Approaches for Studying Mitochondrial Changes during Myoblasts Differentiation*, 2011 (2011). doi:10.4061/2011/845379.
- [52] P. Del Bianco Benedeti, E. Detmann, H.C. Mantovani, S.F.M. Bonilha, N.V.L. Serão, D.R.G. Lopes, W. Silva, C.J. Newbold, M.S. Duarte, Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) with high residual feed intake have increased the expression of genes involved in oxidative phosphorylation in rumen epithelium, *Anim. Feed Sci. Technol.* 235 (2017) 77–86. doi:10.1016/j.anifeedsci.2017.11.002.
- [53] R.L. Hurley, K.A. Anderson, J.M. Franzone, B.E. Kemp, A.R. Means, L.A. Witters,

- The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 29060–29066. doi:10.1074/jbc.M503824200.
- [54] S.C. Bodine, T.N. Stitt, M. Gonzalez, W.O. Kline, G.L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, a Scrimgeour, J.C. Lawrence, D.J. Glass, G.D. Yancopoulos, Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo., *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 1014–1019. doi:10.1038/ncb1101-1014.
- [55] Y. Duan, F. Li, K. Tan, H. Liu, Key mediators of intracellular amino acids signaling to mTORC1 activation, (2015). doi:10.1007/s00726-015-1937-x.
- [56] M. Laplante, D.M. Sabatini, MTOR signaling in growth control and disease, *Cell.* 149 (2012) 274–293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.
- [57] M. Jhanwar-Uniyal, A.G. Amin, J.B. Cooper, K. Das, M.H. Schmidt, R. Murali, Discrete signaling mechanisms of mTORC1 and mTORC2: Connected yet apart in cellular and molecular aspects, *Adv. Biol. Regul.* (2017) 1–10. doi:10.1016/j.jbior.2016.12.001.
- [58] C.C. Dibble, B.D. Manning, Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output, *Nat. Publ. Gr.* 15 (2013) 555–564. doi:10.1038/ncb2763.
- [59] R. Saxton, D. Sabatini, mTOR Signaling in Growth Control and Disease, *Cell.* 169 (2017) 960–976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004.
- [60] D.D. Sarbassov, S.M. Ali, D.M. Sabatini, Growing roles for the mTOR pathway, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 (2005) 596–603. doi:10.1016/j.ceb.2005.09.009.
- [61] B.O. Training, mTOR Pathway, (2009) 1–10.
- [62] R. Zoncu, A. Efeyan, D.M. Sabatini, mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011) 21–35. doi:10.1038/nrm3025.
- [63] M. Laplante, D.M. Sabatini, MTOR signaling in growth control and disease, *Cell.* 149 (2012) 274–293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.
- [64] C.F. Bentzinger, K. Romanino, D. Cloëtta, S. Lin, J.B. Mascarenhas, F. Oliveri, J. Xia, E. Casanova, C.F. Costa, M. Brink, F. Zorzato, M.N. Hall, M.A. Rüegg, Skeletal Muscle-Specific Ablation of raptor, but Not of rictor, Causes Metabolic

- Changes and Results in Muscle Dystrophy, *Cell Metab.* 8 (2008) 411–424. doi:10.1016/j.cmet.2008.10.002.
- [65] J.J. Howell, K. Hellberg, M. Turner, A. Saghatelian, R.J. Shaw, B.D. Manning, Short Article Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex, *Cell Metab.* (2017) 1–9. doi:10.1016/j.cmet.2016.12.009.
- [66] G. Sittampalam, N. Coussens, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, B. Bejcek, M. Glicksman, J. Inglese, P. Iversen, J. Mcgee, O. Mcmanus, L. Minor, A. Napper, J.M. Peltier, T. Riss, O. Trask, J. Weidner, *Assay Guidance Manual*, 2017. doi:PMID:22553881.
- [67] P.P. Artilheiro, J. Lucas, P. Barbosa, N. Helena, C. Souza, M. Tavares, D. Silva, S.K. Bussadori, K. Porta, S. Ferandes, R. Agnelli, M. Ferrari, Análise da proliferação e morfologia de mioblastos C2C12 durante o processo de diferenciação, *Med. Biol.* (2012) 275–278.

CAPÍTULO 2

Efeito do agonista β -adrenérgico ractopamina sobre o metabolismo energético de células C2C12¹

RESUMO

A ractopamina (RAC) é um agonista β -adrenérgico conhecida por seu efeito sobre o anabolismo muscular. Entretanto, poucos estudos têm elucidado seu efeito sobre as vias de sinalização intracelular envolvidas no fenótipo observado. Objetivou-se com este estudo avaliar e entender os mecanismos moleculares que regem o metabolismo energético em células C2C12 expostas à RAC (10 μ m), ao AICAR (500 μ m) e ao tratamento controle (CONT). Os mioblastos expostos à RAC apresentaram maior viabilidade independentemente do tempo de exposição ao aditivo ($P < 0,01$). A abundância das proteínas p-AMPK e AMPK diferiram entre os tratamentos ($P < 0,001$ e $P = 0,027$, respectivamente), sendo menos abundantes na presença de RAC. A abundância das proteínas mTOR e p-mTOR foram similares entre os tratamentos ($P = 0,544$ e $P = 0,072$, respectivamente). Os genes *MKI67* e *p53* foram diferencialmente expressos entre os tratamentos ($P < 0,001$), sendo menos expressos em células expostas à RAC em relação ao CONT e mais expressos na presença de RAC em relação ao AICAR. A expressão do gene *RPS6KB1* também diferiu entre os tratamentos ($P < 0,001$), sendo maior na presença de RAC em relação ao AICAR e similar entre RAC e CONT. O gene *CAPN1* foi diferencialmente expresso ($P < 0,001$), sendo menos expresso na presença de RAC em relação ao AICAR e similar entre os tratamentos RAC e CONT. Diferentemente, a expressão do gene *ATP5H* não foi alterada entre os tratamentos ($P = 0,187$). Conclui-se que o agonista β -adrenérgico ractopamina aumenta a viabilidade celular ao regular o *status* energético via AMPK, reduzindo a apoptose da linhagem de mioblastos C2C12.

Palavras-chave: AMPK, energética celular, mioblastos, mTOR, viabilidade celular.

¹ Artigo a ser submetido no periódico BBRC (Biochemical and Biophysical Research Communications).

β -adrenergic agonist ractopamine acts on energy metabolism of C2C12 cells

ABSTRACT

Ractopamine (RAC) is a β -adrenergic agonist known for its effect on muscle anabolism. However, few studies have elucidated the effect of RAC on signaling pathways involved in the observed phenotype. We aimed to evaluate and understand the molecular mechanism that regulates energy metabolism in C2C12 cells exposed to RAC (10 μ m), AICAR (500 μ m) and control treatment (CONT). The myoblasts presented greater viability regardless time of exposure to RAC ($P < 0.01$). The abundance of p-AMPK and AMPK differed between treatments ($P < 0.001$ and $P = 0.027$, respectively), both of which were less abundant in the presence of RAC. The abundance of mTOR and p-mTOR proteins were similar between treatments ($P = 0.544$ and $P = 0.072$, respectively). *MKI67* and *p53* genes were differentially expressed ($P < 0.001$) among treatments, being less expressed in cells exposed to RAC in relation to CONT and more expressed in the presence of RAC in relation to AICAR. The expression of *RPS6KB1* gene also differed between treatments ($P < 0.001$), being higher in the presence of RAC in relation to AICAR and similar between RAC and CONT. The *CAPN1* gene was differentially expressed ($P < 0.001$), being less expressed in the presence of RAC in relation to AICAR, however, it presented similar expression between RAC and CONT treatments. Differently, *ATP5H* gene expression was not altered ($P = 0.187$) between treatments. It is concluded that RAC increases cell viability throughout regulating energy homeostasis AMPK. Thus, RAC reduces apoptosis and potentiates protein synthesis, evidencing its effect on muscle anabolism.

Key-words: AMPK, cell energetic, cell viability, mTOR, myoblast.

1. INTRODUÇÃO

O mecanismo de ação dos β -adrenérgicos envolve a regulação do metabolismo energético, lipídico e proteico [1] mediante a liberação de estímulos a partir dos receptores β -adrenérgicos 1 e 2 (β AR1 e β AR2, respectivamente) expressos na membrana plasmática das células de diferentes tecidos. Ao se ligar aos receptores, os agonistas β -adrenérgicos promovem ondas de sinalização intracelular através do AMP cíclico (adenosina monofosfato cíclico), resultando em ativação da proteína quinase A (PKA) responsável por regular diferentes fatores envolvidos no metabolismo animal [2].

A ractopamina é um agonista β -adrenérgico da família das fenetanolaminas reconhecida por sua ação sobre os tecidos adiposo e muscular. Os efeitos desencadeados pela ractopamina sobre o tecido muscular envolvem a hiperplasia e a hipertrofia das células [3–5]. Ambos os processos celulares são regulados por importantes vias de sinalização intracelular sensíveis ao *status* energético e que atuam sobre a transcrição de genes envolvidos no crescimento celular [6–8]. Dentre as vias de sinalização intracelular afetadas pela presença dos agonistas β -adrenérgicos, aquelas envolvendo a AMPK (proteína quinase ativada por AMP) e a mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) são potenciais responsáveis pelas alterações no fenótipo.

A AMPK é caracterizada como o principal sensor molecular do nível energético em células de eucariotos [7]. Uma vez ativada, a proteína restaura o equilíbrio energético das células, ativando vias catabólicas e inibindo vias anabólicas [6,9,10]. A mTOR também é responsiva ao *status* energético celular, atuando sobre crescimento, proliferação e síntese proteica celular [11–13]. A ativação da AMPK resulta em inibição da mTOR, sugerindo uma importante relação entre as vias sobre diversos processos celulares [14,15].

Entretanto, estudos envolvendo dados de meta-análise demonstram que embora os β -adrenérgicos atuem de forma efetiva sobre o crescimento muscular, informações sobre os mecanismos moleculares desencadeados pelos aditivos ainda são pouco compreendidas [16]. Considerando-se a ação dos agonistas β -adrenérgicos sobre o aumento da massa muscular a partir da repartição energética [17,18], objetivou-se neste trabalho avaliar e entender os mecanismos moleculares que regem o metabolismo energético em células musculares na presença do agonista β -adrenérgico ractopamina em células C2C12.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo CEUAP-UFV 011/2017 e conduzido no Laboratório de Biotecnologia Animal (Labtec) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (DZO/UFV).

2.1 CULTURA DE CÉLULAS

Os mioblastos C2C12 (CRL-1772, mioblastos de camundongos) utilizados no presente trabalho foram obtidos a partir da *American Type Culture Collection*. As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² e mantidas a 37°C, 95% atm e 5% de CO₂ em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, Grand Island, NY)) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Sigma Chemical Co., St Louis, MO), gentamicina (10 g/mL; Sigma), penicillina 100 U/mL (Gibco, Grand Island, NY) e estreptomicina 100 g/mL (Gibco, Grand Island, NY). O pH do meio de cultivo celular foi ajustado para 7,08, de acordo com as recomendações do fabricante.

2.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Ao atingirem confluência, as células C2C12 foram cultivadas em microplacas de 96 poços para condução dos ensaios de viabilidade celular em uma densidade de 3 x 10⁴ células por poço. No primeiro ensaio, após 24 horas do plaqueamento, os mioblastos C2C12 foram expostas aos tratamentos RAC (DMEM+ 10% FBS + 10 µm ractopamina (*Ractopamine hydrochloride*, Sigma-Aldrich®) [4] e CONT (DMEM + 10% FBS) em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) contendo 6 repetições por tratamento.

No segundo ensaio de viabilidade os mioblastos foram expostas aos tratamentos RAC, AICAR, importante ativador da AMPK, (DMEM + 10% FBS + 500 µm (5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-β-D-ribofuranoside, Acadesine, N1-(β-D-Ribofuranosyl)-5-aminoimidazole-4-carboxamide, Sigma-Aldrich®) [10] e CONT durante 24 horas. Em ambos os ensaios, a ractopamina foi dissolvida em DMSO (Sulfóxido de Dimetil, Sigma-Aldrich®) e o AICAR em água ultrapura.

Cada poço da microplaca de cultivo celular contendo os tratamentos foi lavado com 100 µL de PBS (Phosphate-buffered saline) e, após a retirada completa do meio contendo os tratamentos, adicionou-se 10 µL de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil

tetrazolium]) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific[®], Oregon, USA), a 5mg/mL dissolvido em PBS. Em seguida, a microplaca foi incubada a 37°C de 4 a 6 horas, até que se tornassem visíveis os cristais roxos de formazan [19,20].

Posteriormente, retirou-se o meio de crescimento celular contendo o MTT e adicionou-se 100 µL de DMSO para a solubilização dos cristais, agitando-se a microplaca por 5 minutos em agitador (High-Speed microplate shaker, Illumina[®], San Diego, Califórnia, USA). A microplaca de cultivo foi mantida à temperatura ambiente na ausência de luz por 5 minutos para estabilização da cor. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific[®], Oregon, USA) a 570 nm. A absorbância obtida ao final do ensaio é diretamente proporcional à viabilidade celular e foi calculada a partir da razão entre as médias das absorbâncias dos poços tratados e as médias da absorbância dos poços não tratados multiplicados por 100 [20]. Os valores de absorbância obtidos dos poços que receberam os tratamentos foram descontados do valor de absorbância do branco (absorbância do poço que continha apenas DMSO).

2.3 EXTRAÇÃO E ABUNDÂNCIA DE PROTEÍNAS

Para a extração e a abundância de proteínas, 5×10^5 células foram cultivadas em placas de 6 poços e expostas aos tratamentos RAC, AICAR e CONT durante 24 horas contendo 4 repetições por tratamento. O extrato total de proteínas foi obtido a partir da inclusão de 500 µL de tampão de lise (10 mM Tris HCl, 100 mM de NaCl, 0,5 mM de DDT (dithiothreitol), 2,5 mM de MgCl₂, 0,5% triton X-100 e 1% coquetel inibidor de protease, (Sigma-Aldrich[®])) após a retirada do meio de cultivo contendo os tratamentos. O conteúdo de proteínas foi mensurado por Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA) e a solução de proteína foi estocada a -80°C até que se realizassem as análises posteriores.

As proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Eletrophoresis) a 10%, contendo 60 µg de proteínas por amostra. Os extratos proteicos de todos os tratamentos foram dispostos em cada gel, bem como uma amostra aleatória para controle de carregamento e normalização do sinal das demais amostras.

As proteínas extraídas foram transferidas para as membranas de PVDF (Difluoreto de Polivinilideno) e bloqueadas em solução de 1% de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich[®]) em TBS1x (Tris-Buffered Saline) por 1 hora com suave agitação à

temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos primários anti-AMPK (AMPK α , rabbit, 2603, Cell Signaling Technology[®], Massachusetts, USA) e anti-p-AMPK (AMPK α , rabbit, 2535, Cell Signaling Technology[®], Massachusetts, USA); anti-mTOR (8319, mouse, Santa Cruz Biotechnology[®], Dallas, TX, USA) e anti-p-mTOR (293133, mouse, Santa Cruz Biotechnology[®], Dallas, TX, USA). Os anticorpos primários anti-p-AMPK e anti-p-mTOR foram diluídos na concentração de 1:500 em solução de 1% de BSA em TBS1x durante 16 horas a 4°C com suave agitação. Já os anticorpos primários anti-AMPK e anti-mTOR foram incubados em diluição 1:500 apenas em TBS1x pelo mesmo tempo.

Após incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas três vezes a temperatura ambiente com TBSt (Tris-Buffered Saline e 0,1% Tween[®]) e então incubadas por 1 hora com anticorpo secundário (anti-rabbit IgG- Cell signaling[®] e anti-mouse IgG - Sigma-Aldrich[®]) na concentração de 1:5000 em TBS1x. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes (cinco minutos para cada) com TBSt e reveladas por ECL Clarity[™] 172 substrate (Bio-Rad, Hercules, California, USA). As imagens foram geradas pelo C-digit (Li-Cor) e quantificadas a partir do *software* Image Studio Lite versão 5.2.

2.4 EXPRESSÃO GÊNICA

Para as análises de expressão gênica, 5×10^5 células foram cultivadas em placas de 6 poços e expostas aos tratamentos RAC, AICAR e CONT durante 24 horas contendo 6 repetições por tratamento. Após 24 horas de exposição, os tratamentos foram retirados e os poços lavados com 2,5 ml de PBS. Posteriormente, procedeu-se a extração do RNA total das células utilizando-se Trizol[®] (Invitrogen[™], Thermo Fisher Scientific[®], Oregon, USA) conforme protocolo descrito pelo fabricante. A concentração de RNA total foi obtida por espectrofotometria utilizando-se espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences Inc., Little Chalfont, Reino Unido) e a integridade do RNA foi determinada em gel de agarose 1%. Posteriormente, o cDNA foi sintetizado utilizando-se o GoScript[™] Reverse Transcription System Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante e sua concentração foi determinada por meio do espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences Inc., Little Chalfont, Reino Unido).

Os desenhos dos primers para os genes endógenos β -actina (*ACTB*), hipoxantina guanina fosforibosil transferase (*HPRT1*), gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (*GAPDH*), e os alvos envolvidos no metabolismo energético, ATP sintase complexo mitocondrial subunidade D (*ATP5H*), marca de proliferação Ki-67 (*MKi-67*), proteína quinase ribossomal S6 B1 (*RPS6KB1*), proteína supressor de tumor (*P53*) e calpaína subunidade 1 (*CAPN1*) foram realizados no programa *PrimerQuest* (www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest) fornecido pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA) utilizando-se as sequências disponíveis no banco de dados do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Nome dos genes, abreviação, sequência dos *primers* e código de acesso dos pares de iniciadores de cada gene alvo.

Gene	Abreviação	Primer	Código de acesso no NCBI
β -actina	ACTB	F: CTAGACTTCGAGCAGGAGAT R: CCGCTCGTTGCCAATAG	NM_007393.5
Hipoxantina guanina fosforibosil transferase	HPRT1	F: GCCTAAGATGAGCGCAAG R: GATGGCCACAGGACTAGA	NM_013556.2
Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	GAPDH	F: GGGTGCAGCGAACTTTAT R: CCCTCACAATTTCCATCCC	NM_001289726.1
Marca de proliferação Ki-67	MKI-67	F: CTGCGCTCTACCTACTACA R: CAAAGAAGACCCAGCACTC	NM_001081117.2
Poteína quinase ribossomal S6 B1	RPS6KB1	F:GATACTCGAGGATGAGGTAGAG R: GGAACATTCTGGAGGAAGTG	NM_001114334.1
ATP Sintase, complexo mitocondrial, subunidade D	ATP5H	F: GATGGCTGGGCGTAAAC R: CAGGACTTCAGGGCATTTC	AF_354051.1
Proteína supressor de tumor	P53	F: AGGTAGCGACTAACAGTTAGG R: TGGCAGTCATCCAGTCTT	AB_020317.1
Calpaína subunidade 1	CAPN1	F: GCAGCTATGAGGCTCTTTC R: TCGTTCAGGGCCTTTA	AF_084459.1

A escolha do gene endógeno foi baseada nas curvas de amplificação e de dissociação e na estabilidade de amplificação do gene entre os tratamentos por meio dos programas Genorm e Normfinder, sendo o gene *ACTB* identificado como o melhor gene endógeno.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas em duplicatas utilizando o termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA), a partir do método de Quantificação Relativa, utilizando como detecção o sistema SYBR[®] Green (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA) e o kit GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega corporation, Madison, EUA). Os valores de “threshold cycle” (Ct) obtidos foram posteriormente normalizados a partir do método de delta-ct (ΔCt). O cálculo dos níveis relativos de expressão gênica foi desenvolvido de acordo com o método $2^{-\Delta Ct}$ [21].

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o software SAS[®], versão 9.4, segundo o modelo descrito abaixo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

em que:

Y_{ij} = observação tomada na unidade experimental j submetida ao tratamento i;

μ = constante geral;

T_i = efeito do tratamento i;

ε_{ij} = erro aleatório não observável, pressuposto NID (0, $\sigma^2 e$).

Após a realização da ANOVA, o teste Tukey foi utilizado para comparação das médias entre os tratamentos. As médias foram consideradas diferentes entre si quando $p \leq 0,05$. Considerou-se *outliers* nos ensaios de viabilidade celular as observações que apresentaram valores de resíduos *estudentizados* externos superiores a -2 e +2.

3. RESULTADOS

3.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A formação dos cristais de formazan resultante do metabolismo do MTT em células viáveis pode ser visualizada na Figura 1.

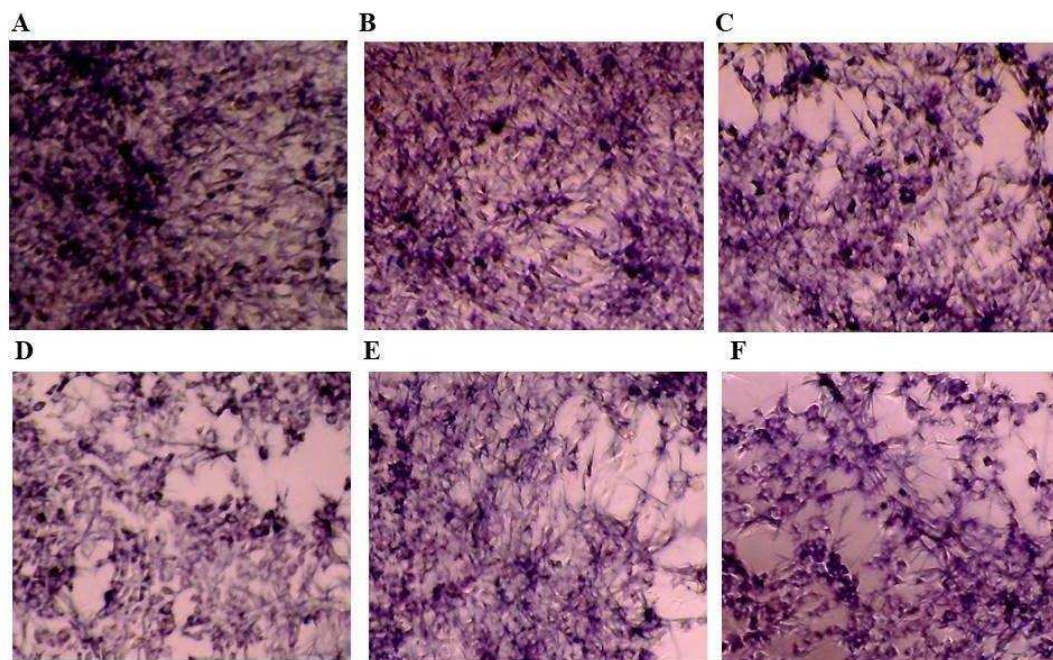


Figura 1: Formação dos cristais de formazan em células C2C12 expostas e não expostas à RAC em diferentes tempos. A, B, C: Células C2C12 expostas à ractopamina por 24, 48 e 72 horas, respectivamente; D, E, F: Células C2C12 não expostas à ractopamina em 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

O tempo de exposição e a presença de RAC tiveram efeitos independentes sobre a viabilidade das células ($P=0,28$). Na presença do aditivo observou-se maior média de viabilidade celular ($P<0,01$) (Tabela 2). Entretanto, a viabilidade celular não foi alterada entre os tempos 24 e 48 horas (Tabela 2). Portanto, adotou-se o tempo de 24 horas para a exposição das células aos tratamentos para a realização dos demais ensaios deste experimento.

Tabela 2: Médias (\pm erro padrão) e nível de probabilidade para ocorrência do erro tipo I para o efeito da ractopamina e o tempo de exposição de mioblastos C2C12 à ractopamina (10 μ M) e ao tratamento controle; COM= com ractopamina; SEM= sem ractopamina; *Letras diferentes indicam diferenças entre médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Aditivo		Tempo (T)*			Valor- <i>P</i>		
COM	SEM	24 horas	48 horas	72 horas	A	T	A×T
0.89 \pm 0.015	0.82 \pm 0.015	0.90 \pm 0.018a	0.86 \pm 0.019ab	0.81 \pm 0.019b	0,004	0,007	0,284

De acordo com os resultados obtidos no primeiro ensaio, outro ensaio de viabilidade celular foi realizado, fixando-se o tempo de exposição das células aos tratamentos em 24 horas. A formação dos cristais de formazan resultante do metabolismo do MTT em células viáveis pode ser visualizada na Figura 2A. Neste ensaio, observou-se que os valores de absorbância diferiram entre os tratamentos ($P < 0,01$). As células expostas à ractopamina apresentaram aumento na viabilidade em, aproximadamente, 19% e aquelas expostas ao AICAR, apresentaram redução na viabilidade em, aproximadamente, 53% em relação ao tratamento controle (Figura 2B).

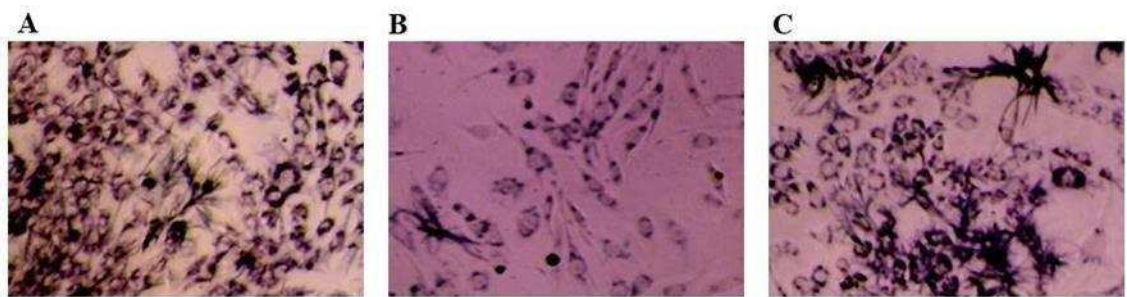


Figura 2A: Formação de cristais de formazan em células C2C12 expostas a diferentes tratamentos durante 24 horas. A: Células C2C12 expostas à ractopamina (10 μ M); B: Células C2C12 expostas ao AICAR (500 μ M); C: Células C2C12 expostas ao tratamento controle.

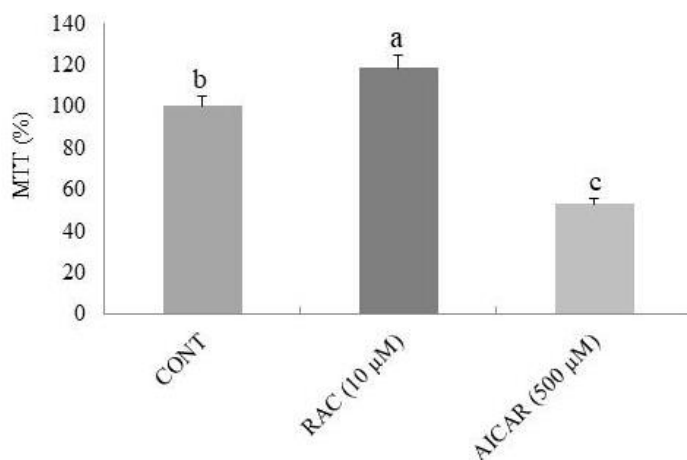


Figura 2B: Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular (%). Células C2C12 expostas aos tratamentos ractopamina (RAC); AICAR e controle (CONT) durante 24 horas. Letras diferentes indicam diferenças pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.2 ABUNDÂNCIA DE PROTEÍNAS INDICADORAS DE ALTERAÇÃO DO STATUS ENERGÉTICO CELULAR

A abundância de p-AMPK diferiu entre os tratamentos ($P < 0,001$), sendo menor na presença de RAC e maior na presença de AICAR em relação aos demais tratamentos. Da mesma forma, a abundância de AMPK também diferiu entre os tratamentos ($P = 0,027$), sendo menor na presença de RAC em relação ao CONT. Entretanto, a abundância das proteínas mTOR e p-mTOR foi similar entre os tratamentos avaliados ($P = 0,544$ e $P = 0,072$, respectivamente). Os gráficos de abundância das proteínas estão sumarizados na Figura 3.

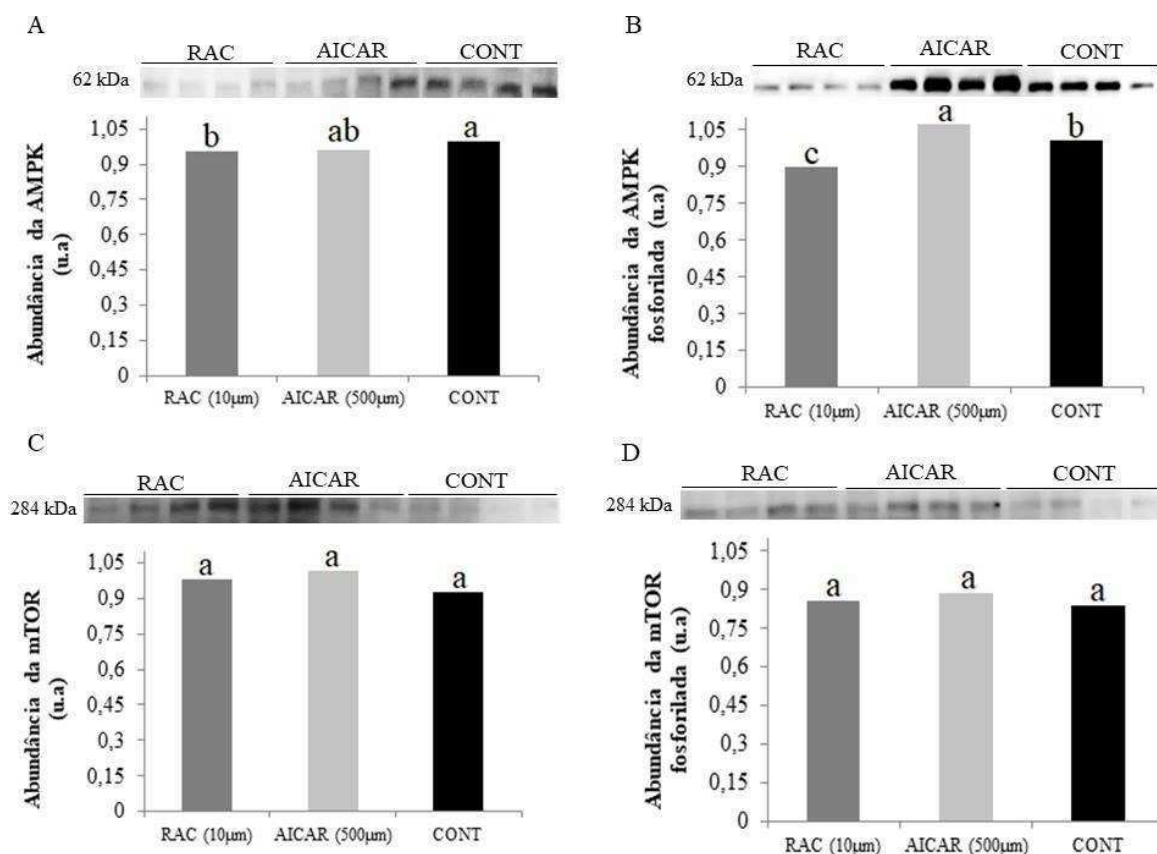


Figura 3: Abundância das proteínas AMPK e mTOR expressas em unidades arbitrárias (u.a). Células C2C12 expostas aos tratamentos ractopamina (RAC); AICAR e controle (CONT) durante 24 horas; **A:** AMPK; **B:** p-AMPK; **C:** mTOR; **D:** p-mTOR. Utilizou-se uma amostra aleatória em cada gel para controle de carregamento e normalização do sinal das demais amostras. Letras diferentes indicam diferenças entre médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão do gene *MKI67* diferiu entre os tratamentos ($P < 0,001$), sendo maior na presença de RAC em relação ao AICAR, no entanto, menor em relação ao CONT. O gene pró-apoptótico *P53* também diferiu entre os tratamentos ($P < 0,001$), sendo mais expresso nos tratamentos controle e RAC em relação ao AICAR e no tratamento controle em relação à RAC. O gene ribossomal *RPS6KB1* foi diferencialmente expresso entre os tratamentos ($P < 0,001$), sendo mais expresso na presença de RAC em relação ao AICAR, no entanto, apresentou expressão similar entre RAC e controle. Diferenças na expressão do gene *CAPN1* também foram observadas entre os tratamentos ($P < 0,001$), sendo menos expresso na presença de RAC em relação ao AICAR, no entanto, similar entre os tratamentos RAC e controle. Diferentemente, a expressão do gene *ATP5H* não foi alterada entre os tratamentos considerados ($P = 0,187$). Os dados de expressão dos genes alvo podem ser visualizados na Figura 4.

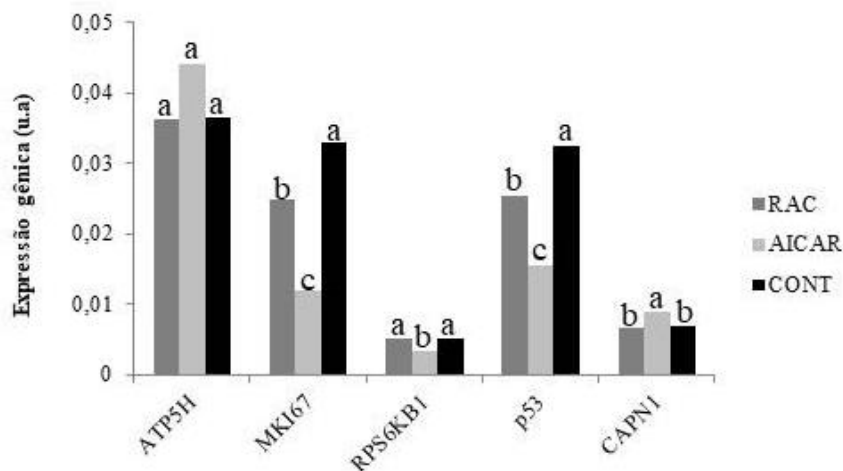


Figura 4: Padrão de expressão em unidades arbitrárias (u.a) dos genes alvo. Células C2C12 expostas aos tratamentos ractopamina (RAC); AICAR e controle (CONT) durante 24 horas; MKI67: Marker Of Proliferation Ki-67; RPS6KB1: Ribosomal Protein S6 Kinase B1; P53: Tumor Protein P53; ATP5H: ATP Synthase, H⁺ Transporting, Mitochondrial Fo Complex Subunit D; CAPN1: Calpain 1. Letras diferentes indicam diferenças entre médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, observou-se expressivo envolvimento do agonista β -adrenérgico ractopamina sobre a energética celular resultando em aumento da viabilidade de mioblastos C2C12.

Os resultados obtidos em ambos os ensaios do MTT evidenciaram que a ractopamina aumentou a viabilidade dos mioblastos C2C12. A clivagem do MTT tem várias propriedades desejáveis para analisar a sobrevivência e a proliferação celular, uma vez que apenas as células vivas e metabolicamente ativas são capazes de metabolizar o composto [22]. O ensaio também pode ser usado para investigar o envolvimento da atividade mitocondrial sobre os processos de ativação celular [23,19]. Diante dos resultados encontrados e considerando-se que o mecanismo de ação desencadeado pelos agonistas β -adrenérgicos sobre o crescimento muscular envolve a repartição energética [17,18], buscou-se entender como a ractopamina afeta a viabilidade de células miogênicas a partir da expressão de genes e proteínas responsivas ao *status* energético celular.

A AMPK é considerada o principal sensor molecular do nível energético de células de organismos eucariotos, sendo ativada por fosforilação em situações de desequilíbrio energético [7,9]. No tecido adiposo, os agonistas β -adrenérgicos atuam sobre a lipólise ao aumentar a abundância de p-AMPK [24]. Entretanto, no presente trabalho, mioblastos C2C12 expostos à ractopamina apresentaram menor abundância de p-AMPK em relação aos demais tratamentos e menor abundância de AMPK em relação ao controle. Esses resultados sugerem que a ractopamina atua sobre a viabilidade celular ao regular o *status* energético de células musculares, reduzindo a abundância de AMPK e, posteriormente, sua ativação por fosforilação. Dessa forma, o aumento da massa muscular por hiperplasia ou hipertrofia observado *in vitro* na presença de ractopamina [3,4,25] pode estar associado ao maior equilíbrio do *status* energético celular regulando positivamente vias de crescimento *downstream*.

A mTOR é uma importante via *downstream* à AMPK, associada a diversos processos metabólicos, controlando a proliferação e a síntese proteica celular [12,13]. Os processos de transcrição e biogênese ribossomal, por exemplo, são controlados pela mTOR e exigem maior relação ATP:ADP. A redução dos níveis energéticos ou de nutrientes resultam em ativação da AMPK que inibe a sinalização da mTOR, sugerindo uma importante relação entre as vias sobre os processos de crescimento celular [9,14]. O aumento da hipertrofia está associado a maior ativação da mTOR em células musculares

esqueléticas de suínos suplementados com ractopamina [5]. Entretanto, no presente estudo, a menor abundância de p-AMPK e AMPK em mioblastos C2C12 expostos à ractopamina não resultou em aumento da abundância de p-mTOR ou mTOR em relação aos controles. Os efeitos da sinalização β -adrenérgica sobre a mTOR é evidenciado nos estágios finais de miogênese, culminando com a diferenciação e maturação dos miotubos [26,27]. Os mioblastos C2C12 são células miogênicas com alta capacidade proliferativa e que permanecem indiferenciados por fatores mitogênicos presentes no soro fetal bovino [28]. Esses resultados sugerem que a ractopamina atua sobre a viabilidade de mioblastos C2C12 modulando a homeostase energética via AMPK.

O gene *ATP5H* codifica para a enzima mitocondrial ATP sintase, associada à homeostase energética e à atividade mitocondrial [29]. Estudos envolvendo a produção de energia celular via fosforilação oxidativa têm utilizado o gene como importante marca de síntese de ATP [30]. Entretanto, no presente trabalho, a expressão do gene foi similar entre os tratamentos. A biogênese mitocondrial é regulada, dentre outros fatores, por ativação da AMPK [31,32] e está diretamente associada à expressão de enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa em miotubos [32]. Em mioblastos C2C12, os níveis de expressão de importantes genes reguladores da biogênese mitocondrial não são detectados, entretanto, quando diferenciadas, células C2C12 apresentam progressivo aumento da expressão desses genes [33], sugerindo que o metabolismo oxidativo seja a principal fonte de energia para as células musculares esqueléticas diferenciadas [33,34]. No presente trabalho, além da expressão do gene *ATP5H* não ter variado entre os tratamentos, não foi possível detectar a expressão do gene *PGC1 α* que está associado à biogênese mitocondrial. Portanto, os dados obtidos sugerem que a manutenção das células em estado indiferenciado não possibilitou o estudo da ativação mitocondrial em mioblastos C2C12, uma vez que a contribuição do metabolismo oxidativo é menor que o glicolítico nessas células.

De acordo com a dinâmica de crescimento do músculo esquelético, maiores taxas de proliferação celular, contribuem para o aumento do número de fibras musculares e acúmulo de mionúcleos [35]. O gene *MKI67* é uma importante marca de proliferação celular [36,37]. Células sob ausência de estímulos proliferativos, reconhecidamente em fase G0 do ciclo celular, não apresentam expressão detectável do gene [38]. Na presença de ractopamina, mioblastos C2C12 apresentaram maior expressão do gene em relação às expostas ao AICAR. Considerando-se a importância do *status* energético sobre a progressão do ciclo celular esses resultados estão de acordo com a regulação positiva da AMPK sobre vias

anabólicas *downstream* na presença de ractopamina. Por outro lado, o gene *MKI67* foi menos expresso em células expostas à ractopamina em relação às células mantidas em condições normais de crescimento. Isso sugere que o aumento da viabilidade dos mioblastos C2C12 expostos à ractopamina não resultou em aumento da proliferação celular. De forma contrária, pesquisas *in vitro* tem sugerido aumento potencial da proliferação celular na presença de ractopamina [4].

O gene *RPS6KB1* codifica para a proteína p70S6 kinase, regulada pelo complexo 1 da mTOR (mTORC1). A proteína p70S6K está associada aos processos que envolvem progressão do ciclo, crescimento e sobrevivência celular, bem como síntese proteica [39]. Dessa forma, o gene *RPS6KB1* é responsivo aos níveis dos fatores de crescimento, citocinas e nutrientes [39], atuando sobre o aumento da hipertrofia muscular [40]. No presente trabalho, observou-se que as células expostas à ractopamina apresentaram maior expressão do gene em relação ao AICAR. Conforme esperado, em relação à situação de desequilíbrio energético promovida pelo AICAR, a ractopamina potencializa o anabolismo celular. Entretanto, células expostas à ractopamina não apresentaram expressão diferencial do gene *RPS6KB1* em relação às células expostas às condições normais de crescimento. A ausência de alteração na ativação da mTOR é compatível com a ausência de variação na expressão do gene entre os tratamentos ractopamina e controle. Por outro lado, considerando-se a repressão do anabolismo celular promovido pelo AICAR, o gene teve sua expressão reduzida em relação à ractopamina, possivelmente devido à sensibilidade à outras vias que também estão associadas à síntese proteica celular.

Além dos genes *MKI67* e *RPS6KB1*, o gene pró-apoptótico *p53* também é responsivo aos fatores mitogênicos. A apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento e o envelhecimento celular e atua como um importante mecanismo homeostático para manter a população de células nos tecidos [41]. A expressão do gene *p53* foi maior em células expostas à ractopamina em relação ao AICAR. A partir dos dados de expressão dos genes *MKI67* e *RPS6KB1* e da abundância de p-AMPK é possível constatar que embora os mecanismos anabólicos sejam evidenciados na presença de ractopamina, em relação às células submetidas ao desequilíbrio energético, a apoptose celular também é um evento importante a fim de manter a população e a renovação celular nessas situações.

Por outro lado, em relação às células expostas às condições normais de crescimento, a ractopamina reduziu a expressão do gene *p53*. Esse resultado parece ser suficiente para justificar o aumento da viabilidade celular na presença de ractopamina. Adicionalmente, a presença do aditivo não resultou em aumento da proliferação e, conseqüentemente, da síntese proteica, logo, a melhora da viabilidade parece estar associada à redução da morte celular por apoptose. Considerando-se a dinâmica de crescimento muscular, uma das principais limitações está o fato de que o número de fibras é essencialmente fixado antes do nascimento para a maioria das espécies e que o crescimento muscular pós-natal depende do número total de fibras musculares definidas na fase pré-natal [17,35]. Dessa forma, ao reduzir a apoptose dos mioblastos, a ractopamina pode contribuir para o aumento potencial da massa muscular, tendo-se em vista que o maior número de mioblastos impacta o número de mionúcleos e, portanto, a hiperplasia e hipertrofia do tecido [4].

As calpaínas são proteases cálcio-dependentes que atuam sobre diferentes eventos celulares e são responsivas ao *status* energético celular [18]. O gene *CAPN1* codifica para subunidade 1 das calpaínas (μ -calpaína) abundante no músculo esquelético que participa da degradação proteica das estruturas celulares [43]. Em situações de desequilíbrio energético, a expressão da μ -calpaína é aumentada [43]. Dessa forma, no presente trabalho, células expostas à ractopamina apresentaram redução na expressão do gene em relação àquelas expostas ao AICAR tendo-se em vista o efeito deste componente em fosforilar a AMPK. Por outro lado, em relação às células expostas às condições normais de crescimento, a presença de ractopamina não resultou em alteração da expressão do gene *CAPN1*. Isso sugere que o aumento da viabilidade celular na presença de ractopamina não está relacionado à alteração na degradação das estruturas celulares.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o agonista β -adrenérgico ractopamina aumenta a viabilidade celular ao regular o *status* energético via AMPK, reduzindo a apoptose da linhagem de mioblastos C2C12.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Y.T. Yang, M. a McElligott, Multiple actions of beta-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue., *Biochem. J.* 261 (1989) 1–10.
- [2] S.E. Mills, Biological basis of the ractopamine response, *Receptor.* (2000) 28–32.
- [3] O. Adeola, R.O. Ball, L.G. Young, Porcine skeletal muscle myofibrillar protein synthesis is stimulated by ractopamine., *J. Nutr.* 122 (1992) 488–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1375287>.
- [4] N.W. Shappell, V.J. Feil, D.J. Smith, G.L. Larsen, D.C. Mcfarland, Response of C 2 C 12 mouse and turkey skeletal muscle cells to the β -adrenergic agonist ractopamine 1 , 2, (2000) 699–708.
- [5] M.S.S. Ferreira, A.C. Alves, L.C.J. Porto, A.P. Schinckel, Z.J. Rambo, V.S. Cantarelli, M.G. Zangeronimo, R. V Sousa, Ractopamine with dietary lysine concentrations above basal requirements of finishing barrows improves growth performance , carcass traits and modi fi es the mTor signalling pathway, (2016).
- [6] S.L. McGee, M. Hargreaves, AMPK-mediated regulation of transcription in skeletal muscle., *Clin. Sci. (Lond).* 118 (2010) 507–18. doi:10.1042/CS20090533.
- [7] S.S. Jäger, C.C. Handschin, J.J. St-Pierre, B.M.B.M. Spiegelman, AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha., *Pnas.* 104 (2007) 12017–12022. doi:10.1073/pnas.0705070104.
- [8] B.O. Training, mTOR Pathway, (2009) 1–10.
- [9] K.A. Coughlan, R.J. Valentine, N.B. Ruderman, A.K. Saha, AMPK activation: A therapeutic target for type 2 diabetes?, *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 7 (2014) 241–253. doi:10.2147/DMSO.S43731.
- [10] A.K. Das, Q. Yang, X. Fu, J. Liang, M.S. Duarte, M. Zhu, G.D. Trobridge, M. Du, Biochemical and Biophysical Research Communications AMP-activated protein kinase stimulates myostatin expression in C2C12 cells, 427 (2012) 36–40.
- [11] R. Saxton, D. Sabatini, mTOR Signaling in Growth Control and Disease, *Cell.* 169 (2017) 960–976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004.
- [12] M. Laplante, D.M. Sabatini, mTOR signaling in growth control and disease, *Cell.* 149 (2012) 274–293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.
- [13] E.A. Dunlop, A.R. Tee, Mammalian target of rapamycin complex 1 : Signalling inputs, substrates and feedback mechanisms, *Cell. Signal.* 21 (2009) 827–835.

doi:10.1016/j.cellsig.2009.01.012.

- [14] J.J. Howell, K. Hellberg, M. Turner, A. Saghatelian, R.J. Shaw, B.D. Manning, Short Article Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex, *Cell Metab.* (2017) 1–9. doi:10.1016/j.cmet.2016.12.009.
- [15] N. Kimura, C. Tokunaga, S. Dalal, C. Richardson, K. Yoshino, K. Hara, B.E. Kemp, L.A. Witters, O. Mimura, K. Yonezawa, A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway, *Genes to Cells.* 8 (2003) 65–79. doi:615 [pii].
- [16] I.J. Lean, J.M. Thompson, F.R. Dunshea, RESEARCH ARTICLE A Meta-Analysis of Zilpaterol and Ractopamine Effects on Feedlot Performance , Carcass Traits and Shear Strength of Meat in Cattle, (2014) 1–28. doi:10.1371/journal.pone.0115904.
- [17] T. Parr, M.H.D. Mareko, K.J.P. Ryan, K.M. Hemmings, D.M. Brown, J.M. Brameld, The impact of growth promoters on muscle growth and the potential consequences for meat quality, *MESC.* (2016). doi:10.1016/j.meatsci.2016.04.022.
- [18] D.E. Moody, D.L. Hancock, D.B. Anderson, Phenethanolamine Repartitioning Agents, in: J.P.F. D’Mello (Ed.), *Farm Anim. Metab. Nutr.*, Londres, 2000: p. 65.
- [19] A. Bahuguna, I. Khan, V.K. Bajpai, S.C. Kang, MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug, *Bangladesh J. Pharmacol.* 12 (2017) 115–118. doi:10.3329/bjp.v12i2.30892.
- [20] J. Van Meerloo, G.J.L. Kaspers, J. Cloos, Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay, *Methods Mol. Biol.* 731 (2011). doi:10.1007/978-1-61779-080-5.
- [21] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, *Methods.* 25 (2001) 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [22] T. Mosmann, Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [23] D. Gerlier, N. Thomasset, Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *J. Immunol. Methods.* 94 (1986) 57–63. doi:10.1016/0022-1759(86)90215-2.
- [24] W. Yin, J. Mu, M.J. Birnbaum, Role of AMP-activated Protein Kinase in Cyclic AMP-dependent Lipolysis In 3T3-L1 Adipocytes *, 278 (2003) 43074–43080.

doi:10.1074/jbc.M308484200.

- [25] P.T. Anderson, W.G. Helferich, L.C. Parkhill, R.A. Merkel, W.G. Bergen, Ractopamine increases total and myofibrillar protein synthesis in cultured rat myotubes., *J. Nutr.* 120 (1990) 1677–83. <http://europepmc.org/abstract/med/1979808>.
- [26] J.G. Ryall, J.E. Church, G.S. Lynch, Novel role for β -adrenergic signalling in skeletal muscle growth, development and regeneration: Proceedings of the Australian physiological society symposium: Signals mediating exercise-induced skeletal muscle remodelling, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37 (2010) 397–401. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05312.x.
- [27] I. Park, J. Chen, mTOR signaling is required for a late-stage fusion process during skeletal myotube maturation, 1 (2005).
- [28] P.P. Artilheiro, J. Lucas, P. Barbosa, N. Helena, C. Souza, M. Tavares, D. Silva, S.K. Bussadori, K. Porta, S. Ferandes, R. Agnelli, M. Ferrari, Análise da proliferação e morfologia de mioblastos C2C12 durante o processo de diferenciação, *Med. Biol.* (2012) 275–278.
- [29] R. Li, H. Zou, Y. Jia, R. Zhao, Glucocorticoid receptor is involved in the breed-dependent transcriptional regulation of mtDNA- and nuclear-encoded mitochondria genes in the liver of newborn piglets., *BMC Vet. Res.* 9 (2013) 87. doi:10.1186/1746-6148-9-87.
- [30] P. Del Bianco Benedeti, E. Detmann, H.C. Mantovani, S.F.M. Bonilha, N.V.L. Serão, D.R.G. Lopes, W. Silva, C.J. Newbold, M.S. Duarte, Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) with high residual feed intake have increased the expression of genes involved in oxidative phosphorylation in rumen epithelium, *Anim. Feed Sci. Technol.* 235 (2017) 77–86. doi:10.1016/j.anifeedsci.2017.11.002.
- [31] J.-Y.P. W J Lee, Mina Kim, Hye-Sun Park, Hyoun Sik Kin, Min Jae Jeon, Ki Sook Oh, Eun Hee Koh, Jong Chul Won, Min-Seon Kim, Goo Taeg Oh, Michung Yoon, Ki-Up Lee, AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR α and PGC-1, *BBRC.* (2005).
- [32] C. Cantó, J. Auwerx, PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure, *Curr. Opin. Lipidol.* 20 (2009) 98–105. doi:10.1097/MOL.0b013e328328d0a4.

- [33] E. Barbieri, M. Battistelli, L. Casadei, L. Vallorani, G. Piccoli, M. Guescini, A.M. Gioacchini, E. Polidori, P. Ceccaroli, L. Stocchi, V. Stocchi, E. Falcieri, Morphofunctional and Biochemical Approaches for Studying Mitochondrial Changes during Myoblasts Differentiation, 2011 (2011). doi:10.4061/2011/845379.
- [34] C.S. Kraft, C.M.R. Lemoine, C.N. Lyons, D. Michaud, C.R. Mueller, C.D. Moyes, C.D.M. Control, A.J. Physiol, C. Physiol, C. C, Control of mitochondrial biogenesis during myogenesis, (2007) 1119–1127. doi:10.1152/ajpcell.00463.2005.
- [35] C. Rehfeldt, I. Fiedler, G. Dietl, K. Ender, Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection, *Livest. Prod. Sci.* 66 (2000) 177–188. doi:10.1016/S0301-6226(00)00225-6.
- [36] M.L. Whitfield, L.K. George, G.D. Grant, C.M. Perou, Common markers of proliferation, *Nat. Rev. Cancer.* 6 (2006) 99–106. doi:10.1038/nrc1802.
- [37] T. Scholzen, J. Gerdes, The Ki-67 protein: From the known and the unknown, *J. Cell. Physiol.* 182 (2000) 311–322. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
- [38] K. Ntzeros, P. Stanier, D. Mazis, N. Kritikos, M. Rozis, E. Anesidis, C. Antoniou, M. Stamatakis, MKI67 (marker of proliferation Ki-67), *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* 3 (2015) 105–116. doi:10.4267/2042/56295.
- [39] F. Bahrami-B, P. Ataie-Kachoe, M.H. Pourgholami, D.L. Morris, P70 Ribosomal protein S6 kinase (Rps6kb1): An update, *J. Clin. Pathol.* 67 (2014) 1019–1025. doi:10.1136/jclinpath-2014-202560.
- [40] S.C. Bodine, T.N. Stitt, M. Gonzalez, W.O. Kline, G.L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, a Scrimgeour, J.C. Lawrence, D.J. Glass, G.D. Yancopoulos, Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo., *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 1014–1019. doi:10.1038/ncb1101-1014.
- [41] S. Elmore, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495–516. doi:10.1080/01926230701320337.
- [42] M. a Ilian, N.E. Forsberg, Gene expression of calpains and their specific endogenous inhibitor, calpastatin, in skeletal muscle of fed and fasted rabbits., *Biochem. J.* 287 (t 1 (1992) 163–171.