

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**EFEITO DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES E DOS  
CORPOS CETÔNICOS NO METABOLISMO DE  
PROTEÍNAS EM RATOS JOVENS**

**Lidiany Góis**

**Dissertação apresentada ao  
Departamento de Bioquímica e  
Imunologia da Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto – USP  
para obtenção do título de Mestre  
em Ciências – área de  
concentração: Bioquímica**

Orientadora: Profa. Dra. Isis do Carmo Kettelhut

**Ribeirão Preto  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Góis, Lidiany.

Efeito dos ácidos graxos livres e dos corpos cetônicos no metabolismo de proteínas em ratos jovens. Ribeirão Preto, 2007.

76p. 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - Departamento de Bioquímica e Imunologia - Programa: Bioquímica

Orientadora: Kettelhut, Isis do Carmo

Data da defesa: 18/10/2007

## **DEDICADO ESTA DISSERTAÇÃO**

*A Deus, pelo dom da vida e por ter permitido a realização deste trabalho,*

*Aos meus pais, Victor e Maria Aparecida, e aos meus irmãos, Victor Hugo, Lilian, Líbia e Lídia, os bens verdadeiramente preciosos que tenho, por todo o carinho e amor que sempre me ofertaram,*

*Aos meus tios Aurora e Mauro, que sempre me valorizaram como pessoa e profissional. Pelo apoio que me deram nas etapas mais importantes de minha vida,*

*À amiga Lila Mina Harada, pela amizade terna e incondicional, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Profa. Isis do Carmo Kettelhut, pela oportunidade de aprendizado e aprimoramento profissional. Pela orientação, amizade e paciência e, em especial, pelo exemplo de fé, dedicação e amor pelo que faz,*

*Ao Prof. Renato Hélios Migliorini, pelo “Bom dia” e “Boa tarde” especiais, pelo exemplo de determinação e dedicação à pesquisa, e pela preocupação sincera com os demais,*

*Aos professores Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes e Dr. Rui Curi, pelas contribuições para o aprimoramento e conclusão deste trabalho,*

*A Neusa Maria Zanon pelo auxílio técnico imprescindível e de grande valor, pela postura de cooperação e comprometimento, pela paciência e boa vontade no ensino das práticas laboratoriais,*

*A Maria Antonieta Garófalo, pela gentileza e amizade carinhosa, pela companhia no laboratório e no Coral, e pelo auxílio técnico sempre que necessário,*

*A Elza Aparecida Filippin (Pila), pela convivência agradável no laboratório, pela postura de respeito e responsabilidade e pelo auxílio de grande importância nos experimentos,*

*A Victor Diaz Galban, pela atitude sempre altruísta, agradável convivência e pelo auxílio com conhecimentos de Bioquímica e Informática,*

*A Andreza Bonifácio e Adriano Duran, pela colaboração no dia-a-dia e pela harmoniosa convivência,*

*À irmã proteolítica Amanda Martins Baviera, pela amizade e apoio, pelo auxílio imprescindível nos experimentos e pelos momentos divertidos sem igual. A D. Zeni, pelo carinho, pela recepção sempre alegre e calorosa em sua casa e pelos almoços deliciosos,*

*À amiga Valéria Ernestânia Chaves, pelo incentivo, amizade companheira e pelos conselhos, sempre se preocupando verdadeiramente comigo,*

*Às amigas e irmãs proteolíticas Luciana Carvalho e Silvia de Paula Gomes, por me valorizarem tanto como pessoa, pela companhia no laboratório, pelo carinho e auxílio sempre de prontidão,*

*Aos amigos e colegas de laboratório: Maria Emília S. Santos, Danúbia Frasson, Alexandre Machado, Marcos P. de Jesus, Eduardo C. Lira, Dawit A. Gonçalves e Tiago Fábio Lorena por tornarem o local de trabalho um ambiente agradável, harmonioso e divertido,*

*Às colegas de pós-graduação Fernanda Cabral, Lizandra, e Sami Yokoo pelo auxílio na realização de alguns experimentos,*

*Ao ex-aluno do Laboratório de Controle do Metabolismo, Prof. Elísio A. Evangelista, pela amizade e apreço,*

*Aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Dr. Marcelo Damário Gomes, Dr. Cláudio Costa Neto, Dr. Vanderlei Rodrigues e Dr. Wilson Lodi, pelo uso de equipamentos e reagentes de seus laboratórios,*

*Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, em especial Ivone, Lúcia, Téia, Ronaldo e Paulinho,*

*A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para minha formação acadêmica,*

*Ao apoio financeiro de CNPq, CAPES e FAPESP.*

# Índice

Resumo .....	i
Summary .....	iii
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>12</b>
2.1. Animais.....	12
2.2. Indução do diabetes .....	12
2.3. Estudo <i>in vitro</i> do papel do ácido palmítico no metabolismo de proteína em músculo esquelético de ratos normais diabéticos .....	13
2.3.1. Preparo do palmitato de sódio ligado à albumina.....	13
2.3.2. Efeito do ácido palmítico na proteólise total e na atividade das vias proteolíticas em músculo esquelético de ratos normais.....	14
I. Procedimento experimental para o estudo da proteólise .....	14
II. Avaliação da atividade proteolítica.....	15
III. Procedimentos experimentais para a avaliação da atividade das vias proteolíticas .....	15
a. via lisossomal .....	16
b. via dependente de cálcio .....	17
c. via dependente de ATP-ubiquitina-proteassoma .....	19
2.3.3. Efeito da inibição da oxidação do ácido palmítico na atividade proteolítica total em músculo esquelético de ratos jovens .....	22
2.3.4. Efeito do 2-bromopalmitato (ácido graxo não metabolizável) na atividade proteolítica total em músculo esquelético de ratos jovens .....	24
2.3.5. Efeito do ácido palmítico na proteólise total em músculo esquelético de ratos diabéticos .....	24
2.3.6. Efeito do ácido palmítico e de inibidores de sua oxidação na síntese total de proteínas em músculo esquelético de ratos normais .....	26
2.4. Estudo <i>in vitro</i> do papel do $\beta$ -OH butirato no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos normais .....	28
2.4.1. Avaliação da atividade proteolítica total .....	28
2.4.2. Avaliação da atividade das vias proteolíticas .....	28
2.4.3. Avaliação da síntese total de proteínas .....	29

2.5. Estudo do efeito da redução dos níveis plasmáticos de AGL na proteólise total em músculos diafragma de ratos diabéticos.....	29
2.5.1. Avaliação da atividade proteolítica total .....	29
2.6. Análise estatística .....	30
2.7. Reagentes .....	30
<b>3. Resultados .....</b>	<b>31</b>
A. Experimentos <i>in vitro</i> .....	31
3.1. Efeito do ácido palmítico na proteólise total e na atividade das vias proteolíticas em músculo esquelético de ratos jovens normais.....	31
a. Proteólise total em <i>soleus</i> e EDL de ratos normais.....	31
b. Participação das vias proteolíticas em <i>soleus</i> de ratos normais .....	35
3.2. Efeito do 2-bromopalmitato (ácido graxo não metabolizado) e da inibição da oxidação do ácido palmítico na proteólise total em <i>soleus</i> de ratos jovens.....	39
3.3. Efeito do ácido palmítico na proteólise total em <i>soleus</i> de ratos diabéticos .....	42
3.4. Velocidade da síntese de proteínas em <i>soleus</i> incubados na ausência e na presença de ácido palmítico e de inibidores de sua oxidação .....	44
3.5. Efeito do <u>β-OH butirato</u> na proteólise total e na atividade das vias proteolíticas em músculo esquelético de ratos jovens .....	45
3.5.1. Proteólise total em <i>soleus</i> e EDL de ratos normais.....	45
3.5.2. Participação das vias proteolíticas em <i>soleus</i> de ratos normais .....	46
3.6. Velocidade da síntese de proteínas em <i>soleus</i> incubados na ausência e na presença de β-OH butirato .....	49
B. Experimentos <i>in vivo</i> .....	50
3.7. Efeito da inibição da lipólise pela administração <i>in vivo</i> de ácido nicotínico na proteólise total em diafragma de ratos normais e diabéticos .....	50
3.7.1. Efeito do ácido nicotínico nas concentrações plasmáticas de AGL .....	50
3.7.2. Atividade proteolítica total .....	53
<b>4. Discussão .....</b>	<b>54</b>
<b>5. Referências .....</b>	<b>64</b>

***RESUMO***

---

## Resumo

Existem relatos na literatura, principalmente no homem, que sugerem que os ácidos graxos livres (AGL) e corpos cetônicos podem exercer um efeito antiproteolítico, poupando as proteínas musculares em situações como jejum e diabetes, podendo, dessa forma, reduzir os processos de degradação das proteínas musculares. Não são conhecidos os efeitos diretos dos ácidos graxos e dos corpos cetônicos no metabolismo de proteínas em músculo esquelético, principalmente de mamíferos como roedores. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito do ácido palmítico e do  $\beta$ -OH butirato no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos jovens, pela facilidade do estudo com músculos isolados *in vitro*, que permitem estimar as atividades das quatro vias proteolíticas (lisossomal, dependente de cálcio, dependente de ATP-Ub-proteassoma e residual) e o processo de síntese de proteínas.

Os resultados do presente trabalho demonstraram o efeito *in vitro* anti-proteolítico do ácido palmítico e do  $\beta$ -OH butirato no músculo esquelético de ratos jovens. Além disso, o ácido palmítico foi capaz de reduzir a atividade proteolítica dependente de cálcio em aproximadamente 50%, bem como o  $\beta$ -OH butirato exerceu seu efeito anti-proteolítico, pela inibição da atividade da via proteolítica dependente de ATP-Ub-proteassoma, em torno de 30%. Foi ainda demonstrado que o ácido palmítico promoveu redução da proteólise em músculo soleus de ratos diabéticos (1, 3, 5 e 10 dias após administração de estreptozotocina) semelhante ao encontrado em animais normais. Por outro lado, não foram observadas alterações no processo de síntese de proteínas totais em *soleus* incubados na presença desses metabólitos. Entretanto, houve redução significativa na velocidade de síntese de proteínas quando a oxidação dos ácidos graxos foi reduzida (~50%) por Etomoxir e Dicloroacetato (inibidores clássicos da  $\beta$ -oxidação). Contudo, a incubação dos músculos *soleus* na presença desses inibidores e de 2-bromopalmitato, um análogo não-metabolizável de ácidos graxos, mostrou um efeito anti-proteolítico na mesma extensão daquele observado com ácido palmítico somente. Tal achado sugere existir um mecanismo diferente da oxidação mitocondrial, responsável por esta ação inibitória do ácido palmítico na degradação de proteínas. Estudos *in vivo* mostraram em ratos adultos diabéticos (5 dias pós administração de aloxana) tratados com ácido nicotínico, cujos níveis plasmáticos de AGL se mantiveram reduzidos por 6

horas, uma redução na proteólise total em diafragma, indicando que outros fatores, além dos níveis plasmáticos de AGL, poderiam estar envolvidos nesta resposta.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o ácido palmítico e o  $\beta$ -OH butirato apresentam um efeito agudo inibitório na degradação de proteínas em músculo *soleus* de ratos e que estudos adicionais são necessários para se investigar os mecanismos pelos quais eles exercem esse efeito, assim como o papel de outros tipos de ácidos graxos nos processos de síntese e degradação de proteínas musculares.

## ***SUMMARY***

---

## Summary

Previous reports from literature have suggested, mainly in man, that plasma free fatty acids (FFA) and ketone bodies may reduce the rates of proteolysis, sparing muscle proteins in several situations like fasting and diabetes.

As far as we know there are no systematic studies on the direct effects of FFA and ketone bodies on muscle protein metabolism in mammals. The main purpose of the present work was to investigate the effects of palmitic acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate on muscle protein synthesis and degradation of young rats, using an *in vitro* preparation that allows the measurement the activities of the four proteolytic pathways (lysosomal, calcium-dependent; ATP-ubiquitin-proteasome dependent and residual). The results of the present work show that FFA (palmitic acid) and  $\beta$ -hydroxybutyrate, incubated *in vitro* with skeletal muscles from young normal rats, decreased the rates of total protein degradation. Palmitic acid (1 mM) reduced the rates of calcium-dependent proteolytic pathway (~50%) and  $\beta$ -hidroxybutyrate inhibited the rates of ATP-Ub-proteasome-dependent process (~30%) in *soleus* of normal rats. Also palmitic acid reduced the total rate of muscle proteolysis of diabetic rats (1, 3, 5 and 10 days after streptozotocin injection). On the other hand, these metabolites did not change the rates of protein synthesis in these muscles. However, the rate of protein synthesis was reduced when palmitic acid oxidation was blocked (~50%) by Etomoxir and Dicloroacetate (classical inhibitors of fatty-acid  $\beta$ -oxidation). But these inhibitors did not alter the anti-proteolytic effect of palmitic acid. The incubation of *soleus* in the presence of bromopalmitate, an analog non-metabolizable of fatty acids, showed an anti-proteolytic effect at the same extension of that observed with palmitic acid. *In vitro* treatment of diabetic adult rats (5 days after aloxan administration) with nicotinic acid, drug that induced a significant reduction of plasma FFA levels (with remained low for 6h), showed a decrease in total diaphragm proteolysis. These data suggest that other factors, besides FFA levels may be involved in this response. The results of the present work show that palmitic acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate have an acute inhibitory effect on soleus protein degradation. Further experiments will be necessary to elucidate the mechanisms responsible for this acute anti-proteolytic effect of palmitic acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate and also the role of other types of fatty acids on muscle protein metabolism of rat skeletal muscles.

## ***INTRODUÇÃO***

---

## 1) Introdução

O músculo esquelético de animais alimentados pode utilizar tanto glicose quanto ácidos graxos como substratos energéticos. No entanto, em situações de privação alimentar, os requerimentos energéticos de carboidratos do músculo são reduzidos, prevalecendo a utilização de ácidos graxos, como parte de uma estratégia para conservar energia e poupar glicose para o metabolismo cerebral (Ma & Foster, 1986; Berger *et al.*, 1976).

Particularmente na fase inicial do jejum, há aumento da utilização de aminoácidos como substratos energéticos, havendo, assim, aumento da proteólise muscular, visto que os estoques corporais de glicogênio são limitados e a produção de glicose para a manutenção da glicemia e seu fornecimento para os tecidos que usam exclusivamente este tipo de substrato, como o sistema nervoso central e as hemácias, passa a depender principalmente da neoglicogênese hepática, a partir de substratos como lactato, glicerol e aminoácidos glicogênicos (Cahill, 1970).

À medida que o jejum se prolonga, ocorre nos organismos dos mamíferos um interessante mecanismo adaptativo de redução da proteólise muscular para a preservação da proteína corporal, fazendo com que o período de sobrevivência dos indivíduos se prolongue. Ao mesmo tempo, nesta mesma fase é que ocorre aumento da hidrólise dos triacilgliceróis do tecido adiposo, com aumento da mobilização de glicerol e ácidos graxos livres, que passam a ser os principais substratos energéticos durante esse período de privação alimentar, diminuindo a utilização de glicose e aminoácidos pelos tecidos periféricos. Assim, a velocidade da proteólise declina com o decorrer do jejum em relação à sua fase inicial (Owen *et al.*, 1967). Há redução da neoglicogênese hepática, a partir de aminoácidos glicogênicos, decorrente de um decréscimo da liberação muscular desses aminoácidos (Sherwin *et al.*, 1975), embora valha a pena ressaltar que outros substratos, principalmente o glicerol continue sendo utilizado para a produção hepática de glicose, além do lactato e piruvato.

As alterações na proteólise muscular observadas no diabetes agudo e crônico são muito similares àquelas encontradas no jejum de curto e longo prazo (Li & Goldberg, 1976). Além disso, Pepato *et al.* (1996) demonstraram que, após períodos prolongados de diabetes (5 e 10 dias), a velocidade de proteólise, que está alta no

período agudo (1 a 3 dias) de insuficiência insulínica, diminui no músculo *extensor digitorum longus* (EDL), atingindo valores similares aos de animais controles ou até mesmo cai abaixo dos valores de ratos controles em músculo *soleus*.

Já durante o jejum prolongado ocorre não somente depleção dos estoques de carboidratos e lipídios, como também a perda progressiva das proteínas corporais, havendo novamente ativação da proteólise muscular, resultando, em última instância, em morte do animal. Dessa forma, qualquer mecanismo que melhore o balanço protéico ao reduzir a proteólise e/ou a oxidação dos aminoácidos durante a ingestão calórica inadequada pode aumentar a sobrevivência (Tessari *et al.*, 1986).

Em contraste à extensa literatura a respeito da relação entre o metabolismo de lipídios e carboidratos, há escassez de informação a respeito da influência dos ácidos graxos no metabolismo de proteínas (Lang, 2006). Os ácidos graxos livres (AGL) são os principais substratos energéticos, sendo liberados do tecido adiposo, após hidrólise dos triacilgliceróis armazenados, e prontamente utilizados pelos músculos esquelético e cardíaco, pelo fígado e outros tecidos (Bistrian *et al.*, 1981). Durante o jejum, as concentrações plasmáticas de insulina e glicose diminuem, enquanto aquelas de AGL, corpos cetônicos, aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina, valina), alanina e glutamina aumentam (Tessari *et al.*, 1986).

Cahill (1970) sugeriu que a redução da proteólise muscular no diabetes crônico ou no jejum prolongado possa ser decorrente das altas concentrações plasmáticas de corpos cetônicos ou AGL, assim como há hipóteses de que aminoácidos de cadeia ramificada (Pepato *et al.*, 1996) e também as baixas concentrações de hormônios tireoidianos (Kettelhut *et al.*, 1988) possam contribuir para essa resposta. Estudos sistemáticos que confirmam essas hipóteses são poucos na literatura e a maioria foi realizada em seres humanos, havendo reduzido número de relatos em animais de experimentação, como roedores. Alguns deles (Sherwin *et al.*, 1975; Tessari *et al.*, 1986; Nair *et al.*, 1988) sugerem que concentrações elevadas de AGL e corpos cetônicos na circulação podem ter um efeito protetor sobre o metabolismo de proteínas. Esses autores propõem que níveis plasmáticos elevados de AGL aumentam a síntese protéica e/ou reduzem a proteólise. Estudo realizado por Tessari *et al.* (1986) concluiu que a disponibilidade aumentada de AGL estava inversamente relacionada à velocidade de proteólise corporal total (decréscimo da velocidade de aparecimento de leucina), mas não havia alteração da síntese protéica (medida pela velocidade de disponibilidade de

leucina não oxidada). Além disso, Ferrannini *et al.* (1986) demonstraram que a elevação dos níveis circulantes de AGL por infusão de lipídios e heparina em humanos promoveu um efeito hip aminoacidêmico, comprovado pela queda nos níveis plasmáticos de aminoácidos glicogênicos (alanina, glicina, fenilalanina, serina, treonina e cisteína) e aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), mas salientaram que essa resposta pode ter sido facilitada pela insulina, já que houve estímulo de sua liberação pela infusão de AGL.

Quando a concentração plasmática de corpos cetônicos aumenta e os mesmos passam a ser também utilizados como substratos energéticos pelo cérebro, a necessidade de glicose produzida a partir de aminoácidos pela gliconeogênese diminui, ocorrendo concomitante queda da proteólise (Owen *et al.*, 1967). Essa hipótese é fundamentada pelos achados de redução da produção de glicose em humanos e em animais, e um decréscimo na excreção urinária de nitrogênio (uma medida indireta da degradação de proteína corporal) em homens jejuados durante a infusão endovenosa de  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ -OHB) (Pawan & Semple, 1983). Uma relação linear entre retenção de nitrogênio em pacientes no pós-operatório e sua cetonemia (Williamson *et al.*, 1977) dá suporte adicional a essa hipótese.

Sherwin *et al.* (1975) demonstraram que a infusão de corpos cetônicos reduziu as concentrações circulantes de alanina em indivíduos submetidos a jejum prolongado. Além disso, estudo realizado por Nair *et al.* (1988), em indivíduos saudáveis infundidos com  $\beta$ -OHB, mostrou redução na oxidação de leucina e aumento na velocidade de síntese de proteína muscular esquelética em comparação aos indivíduos infundidos com salina.

No entanto, permanece ainda não esclarecido se alterações agudas nos níveis circulantes de ácidos graxos e corpos cetônicos podem afetar o metabolismo protéico (Nielsen *et al.*, 2002), assim como se esses metabólitos têm um papel direto nos processos de síntese e degradação de proteínas no tecido muscular.

Tessari *et al.* (1986) observaram que a infusão de ácido nicotínico (um potente inibidor da lipólise no tecido adiposo) em cães jejuados promoveu um aumento significativo na oxidação de leucina concomitantemente a uma redução de 80% nas concentrações plasmáticas de AGL. A redução das concentrações de AGL em indivíduos saudáveis promovida pela administração de Acipimox (um análogo do ácido nicotínico que inibe a mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo) foi

capaz de aumentar a produção total de nitrogênio uréico e a excreção de uréia durante o jejum (Fery *et al.*, 1997).

Além disso, o principal achado do estudo realizado por Norrelund *et al.* (2003) foi que a inibição da lipólise por Acipimox em indivíduos saudáveis aumentou a produção de nitrogênio uréico e a degradação de proteína muscular (avaliada por fenilalanina marcada) em aproximadamente 50% e a restauração dos altos níveis de AGL (infusão intralipídica) reestabeleceu as concentrações proporcionais de uréia e diminuiu a degradação protéica corporal total em 10-15%.

Estudos recentes de Zhou *et al.* (2007), utilizando cultura de células C2C12 (miotúbulos) incubadas por 48h na presença de ácidos graxos saturados (palmítico) e insaturados (oléico), mostraram ocorrer nessas condições aumento da proteólise e ativação da E3 ligase por supressão da via de sinalização IRS-1/Akt. Os autores discutem esses achados à luz de dados obtidos de camundongos submetidos a uma dieta rica em lipídios por cinco meses e que apresentam altos níveis circulantes de AGL (2,6 vezes maiores que o normal), redução dos níveis de adiponectina, hiperglicemia e hiperinsulinemia, demonstrando ocorrer uma situação de resistência à insulina. Acredita-se então que, nessas condições, os AGL podem promover aumento da proteólise muscular. Parecem, assim, ser bastante diferentes os efeitos agudos e crônicos dos ácidos graxos no metabolismo de proteínas em músculo e ainda parecem depender da situação fisiológica em que o animal se encontra, levando em conta seu perfil hormonal e nutricional.

Considerando a diversidade de respostas do metabolismo protéico muscular frente aos níveis de ácidos graxos, o presente trabalho teve como objetivo investigar se os ácidos graxos livres e os corpos cetônicos exercem algum efeito direto no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos normais e ratos submetidos a situações catabólicas, como o diabetes.

A massa muscular esquelética depende de um balanço entre os processos de síntese e degradação de proteínas (Cuervo & Dice, 1998). Em adultos saudáveis, o *turnover* de proteínas musculares ocorre numa velocidade de aproximadamente 1-1,5kg de massa muscular por dia (Mitch & Price, 2001). Em muitas situações caracterizadas por atrofia, a degradação aumentada de proteínas, ao invés da redução do processo de síntese, parece ser o principal responsável pela depleção da massa muscular (Costelli *et al.*, 2005).

A degradação de proteínas está associada à manutenção da homeostase intracelular que ocorre para adaptar as células às mudanças ambientais. Além disso, está envolvida em muitas outras funções básicas, incluindo eliminação de proteínas anormais e danificadas, controle do ciclo e diferenciação celular, crescimento corporal, tráfico intracelular de proteínas, apresentação de antígenos e fornecimento de aminoácidos para a neoglicogênese durante o jejum (Cuervo & Dice, 1998; Kettelhut *et al.*, 1994).

A perda de massa muscular ocorre em uma variedade de doenças, como câncer, diabetes, SIDA, sepse, síndrome de Cushing, assim como em músculos específicos após desnervação ou desuso (Lecker *et al.*, 1999) ou após jejum prolongado.

O processo de atrofia do músculo esquelético pode ser resultado de fatores locais e sistêmicos. Pode depender de alterações metabólicas e hormonais que afetam diretamente este tecido ou pode refletir distúrbios da função nervosa, como ocorre em casos de distrofias musculares, miopatias neurológicas, desuso e desnervação, ou, por outro lado, pode ocorrer como um componente significativo da caquexia, como se observa na SIDA, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica ou distúrbios auto-imunes. A caquexia compromete o manejo terapêutico dos pacientes, prejudica a recuperação e reduz a eficiência do tratamento. A depleção da massa muscular reduz significativamente a qualidade e a expectativa de vida porque a função contrátil e o conteúdo de proteínas do tecido são comprometidos (Costelli *et al.*, 2005).

Os mecanismos pelos quais fatores hormonais, nutricionais e neurais alteram a proteólise muscular, assim como a contribuição das diferentes vias proteolíticas intracelulares na degradação das proteínas musculares em diferentes situações fisiológicas ou patológicas ainda não são totalmente conhecidos e continuam sendo assunto de investigação.

Quatro principais sistemas proteolíticos existem no músculo e nas células em geral: o sistema lisossomal, o dependente de ATP-Ub-proteassoma, o dependente de cálcio e sistema residual (ou independente de ATP).

### **Sistema proteolítico lisossomal**

A proteólise lisossomal foi o primeiro sistema proteolítico descrito, sendo o mais conhecido. O sistema endossomo-lisossomo baseia-se na atividade de

proteases acídicas (catepsinas B, D, E, H, K, L etc.), ativas em pH ácido em torno de 4 a 5 ou inferior, e está envolvido principalmente na degradação de proteínas de meia-vida longa (Kadowaki & Kanazawa, 2003).

Proteínas extracelulares e proteínas da membrana plasmática, uma vez internalizadas em estruturas vesiculares chamadas endossomos, podem ser completamente degradadas pela fusão deles com os lisossomos (Cuervo & Dice, 1998). Inicialmente, acreditava-se que a degradação protéica que ocorre no interior dos lisossomos era inespecífica, não seletiva, e isenta de regulação; porém, na continuidade dos estudos ficou comprovado que a proteólise lisossomal apresenta também especificidade, sendo que proteínas que possuem uma seqüência de aminoácidos KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) se ligam a uma proteína da família HSP70 (proteínas de choque térmico) de 73kDa presente na membrana dos lisossomos, conhecida por HSC73. O complexo formado entre o substrato e a HSC73 é importante para promover o transporte da proteína para o interior da organela, ocorrendo assim sua degradação (Dice, 1990; Cuervo *et al.*, 1995).

A contribuição da via lisossomal para o catabolismo protéico em situações de perda muscular não está ainda totalmente clara. Resultados obtidos com músculos esqueléticos isolados de animais caquéticos portadores de hepatoma levaram à conclusão da inexistência de um papel importante desta via na degradação das proteínas totais (Baracos *et al.*, 1995). Por outro lado, uma elevação da atividade das catepsinas foi observada em músculo e fígado de camundongos inoculados com células tumorais L1210 (Greenbaum & Sutherland, 1983), e aumentos dos níveis de mRNA da catepsina L em músculo esquelético de ratos sépticos (Jagoe *et al.*, 2002) ou portadores de tumor (Sarcoma de Yoshida) (Deval *et al.*, 2001) e da catepsina B em biópsias de músculo de pacientes com câncer de pulmão foram relatados (Jagoe *et al.*, 2002).

Embora saiba-se que hormônios (como os tireoidianos) e fatores nutricionais (como dieta com alto conteúdo protéico, jejum) podem interferir na atividade da via lisossomal, ainda não se conhece o papel de substratos energéticos, como dos AGL e corpos cetônicos na atividade deste processo proteolítico.

### **Sistema proteolítico dependente de cálcio**

A proteólise dependente de cálcio se baseia na atividade de proteases contendo cisteína em seu centro ativo (cisteína- ou tiol-proteases) conhecidas como

calpaínas primeiramente relatadas por Guroff (1964) na fração solúvel de neurônios de ratos. Apesar da maioria dos estudos enfatizarem duas formas principais, a microcalpaína ( $\mu$ -calpaína ou calpaína I) e a milicalpaína (m-calpaína ou calpaína II), ativadas *in vitro* por concentrações de cálcio da ordem de  $\mu$ M e mM respectivamente, pelo menos 15 tipos de calpaínas diferentes já foram identificadas em mamíferos (Suzuki *et al.*, 2004). As calpaínas são ubiquamente expressas, mas algumas delas são detectáveis principalmente em tecidos particulares, como a calpaína III (com peso molecular de 94 kDa e por isso denominada de p94) no músculo esquelético de mamíferos (Sorimachi *et al.*, 1989).

A  $\mu$ - e a m-calpaína, que compartilham 50-60% de homologia, existem como heterodímeros com peso molecular de 110kDa constituídos por uma subunidade de 80 e outra de 30 kDa. A primeira consiste em seis domínios e é a responsável pela atividade proteolítica e pela ligação ao íon cálcio. A segunda subunidade é formada por dois domínios e parece estar relacionada com associação da enzima à membrana plasmática, assim como com a regulação da atividade catalítica da enzima (Carafoli & Molinari, 1998; Goll *et al.*, 2003). Verificou-se que, em altas concentrações de cálcio, a subunidade menor dissocia da subunidade maior resultando em ativação proteolítica (Pal & Jia, 2001). Assim, a subunidade de 30kDa poderia agir como um inibidor da atividade catalítica da subunidade de 80kDa (Sorimachi *et al.*, 1996).

As calpaínas estão normalmente presentes no compartimento citosólico em um estado inativo. Quando a concentração intracelular de cálcio aumenta, as moléculas inativas translocam para a membrana plasmática onde elas são ativadas por cálcio e fosfolipídios, resultando em dissociação dos dímeros e liberação da subunidade de 80kDa (Suzuki *et al.*, 2004). A ligação do cálcio foi sugerida induzir mudanças conformacionais que abole os impedimentos estruturais no domínio catalítico e leva à associação dos componentes do sítio ativo (Strobl *et al.*, 2000). Além do cálcio, outros fatores contribuem para regular a atividade das calpaínas, tais como a fosforilação ou autoclivagem parcial do domínio I. A fosforilação em particular pode resultar em atividade aumentada ou reduzida dependendo da quinase envolvida (Shiraha *et al.*, 2002). A calpaína possui um inibidor endógeno específico, denominado calpastatina, o qual já foi isolado de diversos tecidos (Otsuka & Goll, 1987), inclusive da musculatura esquelética (Nakamura *et al.*, 1984). Além da concentração dos íons cálcio, o controle da atividade das calpaínas I e II

parece depender da atividade desse inibidor. *In vitro*, a calpaína pode ser inibida por agentes tiol bloqueadores tais como leupeptina, Ep<sub>-475</sub>, E<sub>64</sub>, mersalil, quimostatina, iodoacetamida e também por quelantes de cálcio como EGTA (Tischler *et al.*, 1990).

O significado fisiológico do sistema proteolítico dependente de cálcio não é ainda muito conhecido. As calpaínas desempenham uma proteólise limitada de seus substratos, resultando em peptídios menores, que podem ser degradados por outros sistemas proteolíticos (Williams *et al.*, 1999). As calpaínas estão envolvidas em processos como, por exemplo, proliferação celular, diferenciação, migração, morte apoptótica e expressão gênica (Nixon, 2003).

No caso da degradação das proteínas musculares, as calpaínas somente desempenham um papel importante quando a homeostase do cálcio é perturbada (Anderson *et al.*, 1998). Diversos estudos mostraram que a perda muscular em distrofias, miosites corporais, atrofia por desnervação e diabetes, queimaduras e sepse está associada a aumento dos níveis intracelulares de cálcio (Christensen *et al.*, 2004; Furuno *et al.*, 1990; Pepato *et al.*, 1996). Além disso, alguns hormônios parecem ter efeito na atividade desta via: as catecolaminas (Navegantes *et al.*, 1999, 2001) e a testosterona (Galo, 1995) exercem ação anti-proteolítica na musculatura esquelética através da inibição da via dependente de cálcio. Também não se conhece se os ácidos graxos ou corpos cetônicos podem interferir na atividade dessas enzimas e, por conseguinte, alterar o processo proteolítico dependente de cálcio.

### **Sistema proteolítico dependente de ATP-Ub-proteassoma**

No compartimento citosólico, existe um sistema proteolítico solúvel que requer ATP para sua atividade e envolve um polipeptídio de 76 aminoácidos, ubiquitina (Ub). Inicialmente, as proteínas destinadas à degradação são “marcadas” por um processo de poliubiquitinação, que envolve a ligação covalente do substrato a moléculas de ubiquitina, por meio da ação sequencial da enzima ativadora de Ub (E1), enzimas conjugadoras de Ub (E2) e enzimas ligadoras de Ub (E3) (Hershko *et al.*, 1979). Foram identificadas duas E3-ligases específicas do músculo, MAFbx/atrogina-1 (proteína *F-box* de atrofia muscular) e MuRF-1 (*RING-finger 1* músculo-específica), que parecem ser superexpressas sistematicamente em diversas condições catabólicas (Bodine *et al.*, 2001). Nesse processo de conjugação, múltiplas moléculas de Ub são adicionadas ao substrato, formando uma cadeia de poliubiquitina.

Em seguida, conjugados proteína-ubiquitina são reconhecidos por um complexo enzimático denominado proteassoma 26S, composto por duas partículas regulatórias 19S e um centro catalítico 20S que, por sua vez, possui quatro anéis constituídos por 7 subunidades  $\alpha$  não-catalíticas e 7 subunidades  $\beta$  catalíticas repetidas ( $7\alpha$ ,  $7\beta$ ,  $7\beta$  e  $7\alpha$ ). Mais especificamente, subunidades do complexo regulatório reconhecem as cadeias poliubiquitinadas levando ao desenovelamento da proteína-substrato e sua inserção no interior do proteassoma, que possui múltiplas atividades proteolíticas dependentes de ATP que degradam o substrato em fragmentos polipeptídicos (normalmente de 5 a 12 aminoácidos) (Kisselev *et al.*, 1999). Endo e exopeptidases (tripeptidil-peptidase II, aminopeptidases e outras) completam o processo de degradação no citosol até a geração de aminoácidos livres (Price, 2003).

Esse complexo proteolítico catalisa a degradação seletiva de proteínas anormais oriundas de erros pós-sintéticos, mutações, oxidações e desnaturação, proteínas reguladoras de meia-vida curta, de reticulócitos em maturação e de fibroblastos em crescimento. Pode também estar envolvido na degradação de produtos de oncogenes viral e celular, de fatores de transcrição (Jentsch *et al.*, 1990), de enzimas chaves de vias metabólicas e de proteínas normais em respostas a mudanças energéticas e condições nutricionais, como o jejum (Ciechanover, 1987; Han *et al.*, 1988; Kettelhut *et al.*, 1994). Acredita-se que o sistema ubiquitina-proteassoma tenha a principal contribuição no processo de degradação de proteínas relacionado à perda de massa muscular. A expressão de genes referentes a esse sistema e os níveis de conjugados ubiquitina-proteína estão aumentados em músculos atroficos em condições, tais como sepse, desnervação, SIDA, diabetes e câncer (Pepato *et al.*, 1996; Costelli & Baccino, 2003).

Pacientes em condições catabólicas (trauma, sepse, insuficiência renal crônica etc.) apresentam níveis mais altos de mRNA de componentes da via proteolítica dependente de Ub-proteassoma em músculo esquelético do que pacientes que não apresentam atrofia muscular, confirmando a importância dessa resposta em humanos (Bossola *et al.*, 2001).

Sinais extracelulares que aceleram a proteólise através do sistema Ub-proteassoma incluem citocinas, acidose, níveis plasmáticos reduzidos de insulina (Tisdale, 1999), hormônios tireoidianos (Dardevet *et al.*, 1995) e glicocorticóides, implicados como sinais diretos ou indiretos que estimulam a proteólise e aumentam os níveis de mRNA dos componentes dessa via.

Outras proteases podem agir em associação ao sistema dependente de Ub-proteassoma. As calpaínas desempenham papéis chaves na dissociação das proteínas do sarcômero e na desintegração das bandas-Z, resultando na liberação de miofilamentos que, por sua vez, são degradados pelo proteassoma (Attaix *et al.*, 2003). Além disso, a expressão de diversos genes relacionados à proteólise (incluindo da catepsina L e de diversos componentes do sistema Ub-proteassoma) foram negativamente regulados em camundongos *Knocked out* para a calpaína p94, específica do músculo esquelético (Attaix *et al.*, 2003). No entanto, deve-se demonstrar mais claramente se existem ligações funcionais entre as calpaínas, a caspase 3, a catepsina L, por exemplo, e o sistema Ub-proteassoma (Attaix *et al.*, 2005).

Em músculos depletados de ATP, permanece ainda uma atividade proteolítica residual. Embora essa atividade proteolítica não constitua um sistema ou uma via proteolítica propriamente dita, ela passou a ser chamada de via residual ou independente de ATP. Não se conhecem quais as enzimas envolvidas nesse processo proteolítico, seus substratos preferenciais, nem como é regulada (Kettelhut *et al.*, 1988), embora estejam envolvidas nesse processo provavelmente as peptidases, as caspases e outras. Alguns trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram redução da atividade dessa via em apenas três situações: em músculos *soleus* de ratos após 10 dias da administração de estreptozotocina (Pepato *et al.*, 1996), após 4 dias de simpatectomia química induzida pelo tratamento com guanetidina (Navegantes *et al.*, 1999) e em músculo *soleus* de ratos alimentados com dieta rica em proteínas e mantidos em jejum de 48 horas (Doretto, 1995). Mas a importância fisiológica desses achados ainda permanece para ser esclarecida. Também não se conhece se ácidos graxos ou corpos cetônicos podem interferir diretamente na atividade das vias dependente de ATP-Ub-proteassoma e residual.

Assim, os objetivos gerais do presente trabalho foram investigar o papel dos ácidos graxos livres e dos corpos cetônicos no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos normais e diabéticos. Para isso foram estudados músculos esqueléticos provenientes de ratos normais ou após indução de diabetes, incubados na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico, um ácido graxo saturado de 16 átomos de carbono, de maior ocorrência no plasma ou de um dos principais corpos cetônicos,  $\beta$ -OH butirato, metabólito que tem sua produção aumentada em situação de jejum ou de insuficiência insulínica e que pode ser usado

como substrato energético pelas células musculares esquelética, cardíaca e mesmo por células neuronais.

Os objetivos específicos foram estudar:

- O efeito *in vitro* do ácido palmítico:
  - a) na atividade proteolítica total em músculo *soleus* (de fibras predominantemente oxidativas ou do tipo I) e EDL (de fibras predominantemente glicolíticas ou do tipo II) de ratos normais e diabéticos (1, 3, 5 e 10 dias após administração de estreptozotocina)
  - b) nas vias de degradação de proteínas (lisossomal, dependente de cálcio, dependente de Ub-proteassoma e residual) em *soleus* de ratos normais
  - c) na velocidade de síntese de proteínas em *soleus* de ratos normais.
  
- O efeito *in vitro* da inibição da oxidação mitocondrial do ácido palmítico (por Etomoxir e Dicloroacetato):
  - a) na proteólise total em músculo *soleus* de ratos normais
  - b) na velocidade de síntese de proteínas em *soleus* de ratos normais.
  
- O efeito *in vitro* do 2-bromopalmitato (ácido graxo não oxidável) na proteólise total em músculo *soleus* de ratos normais
  
- O efeito *in vitro* do  $\beta$ -OH butirato:
  - a) na proteólise total em músculo *soleus* e EDL de ratos normais
  - b) nos diferentes sistemas proteolíticos (lisossomal, dependente de cálcio, dependente de Ub-proteassoma e residual) em *soleus* de ratos normais
  - c) na velocidade de síntese de proteínas em *soleus* de ratos normais.
  
- O efeito *in vivo* de inibidores da lipólise no tecido adiposo (ácido nicotínico) na proteólise total em diafragma de ratos normais e diabéticos.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

## 2) Materiais e Métodos

### 2.1) Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 70 e 80g ou entre 200 e 220g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - USP. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica, recebendo dieta balanceada (NUVLAB CR1 - NUVITAL) para roedores e água *ad libitum* em ambiente com ciclos luz-escuro de 12 horas (luzes acesas às 6:00h e apagadas às 18:00h) e temperatura controlada de 25°C. Todos os animais permaneceram nestas condições ambientais por pelo menos 24 horas antes de qualquer procedimento experimental.

Todos os experimentos foram realizados pela manhã, entre 8:00 e 11:00 horas. O sacrifício dos animais foi realizado por deslocamento cervical ou decapitação (quando necessária coleta de sangue). Os músculos *soleus* e EDL foram imediatamente removidos e pesados em balança digital (ACATEC BEM 0100).

### 2.2) Indução do diabetes

Em alguns experimentos, foi induzido diabetes experimental por estreptozotocina (STZ) ou aloxana, conforme descrito a seguir. Os animais utilizados para a indução do diabetes permaneceram por pelo menos dois dias no biotério antes da administração das drogas, recebendo água e alimento *ad libitum*. Precedendo o dia da indução do diabetes, os mesmos animais foram colocados em jejum de 14 a 16 horas, sendo mantidos somente com água.

Os experimentos de indução de diabetes por STZ foram realizados com animais jovens. A STZ foi dissolvida em tampão citrato 0,01M (pH 4,5), sendo protegida da luz. Após anestesia dos animais com éter etílico, a STZ foi injetada na veia jugular em até 5 minutos após sua dissolução. Foram administradas 135mg STZ/kg de peso corporal em volume de 0,2mL por 80g de peso do animal (Pepato *et al.*, 1996), que neste dia apresentavam peso corporal de cerca de 70g a 80g. Após 90 minutos da administração de STZ, os animais voltaram a receber alimento e água *ad libitum*.

Em relação à indução do diabetes por aloxana, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 220g. Foram escolhidos animais

adultos para este experimento devido ao fato de seus depósitos adiposos serem maiores. A aloxana foi dissolvida em salina 0,9%, sendo protegida da luz. Após anestesia dos animais com éter etílico, a aloxana foi injetada na veia jugular. Foram administrados 40 mg aloxana/kg de peso corporal em volume de 0,2mL por 200g de peso do animal, que neste dia apresentavam peso corporal de cerca de 200g a 220g. Após 180 minutos da administração de aloxana, os animais voltaram a receber alimento e água *ad libitum*.

Nos dois casos, a indução do diabetes foi comprovada pela determinação da glicemia dos animais. Para isso, o sangue foi coletado em tubos heparinizados, após decaptação dos animais ou obtido pela cauda (realização de corte cerca de 2mm de sua extremidade distal) em diferentes dias após administração de STZ ou no 1º, 3º e 5º dia após administração de aloxana. Particularmente no 5º dia (dia do experimento), as coletas do sangue foram realizadas antes do início do tratamento dos animais com ácido nicotínico e imediatamente antes da retirada dos músculos diafragma.

Após as coletas, o sangue foi centrifugado para obtenção do plasma e a determinação das concentrações de glicose foi realizada pelo método enzimático da glicose-oxidase (Bergmeyer & Bernt, 1974) pelo Kit glicose-oxidase da Labtest, através do espectrofotômetro U-200I HITACHI em comprimento de onda de 505nm. Foram utilizados apenas animais que apresentaram valores de glicemia iguais ou superiores a 400mg/dL. No caso dos animais que foram administrados com aloxana, o plasma foi também utilizado para quantificação dos níveis plasmáticos de AGL, que foram determinados pelo método de Dole & Meinertz (1960).

## **2.3) Estudo *in vitro* do papel do ácido palmítico no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos normais e diabéticos**

### **2.3.1) Preparo do palmitato de sódio ligado à albumina**

Para a solubilização do ácido palmítico no meio de incubação e sua utilização adequada pelo tecido muscular, procede-se a sua ligação à soroalbumina bovina livre de ácidos graxos. Primeiramente, procede-se à formação do palmitato de sódio: prepara-se o etilato de sódio, dissolvendo uma porção de cerca de 500mg de sódio metálico sem impurezas em 20ml de etanol absoluto. Enquanto ocorre essa

dissolução, o ácido palmítico é pesado em quantidades adequadas para a obtenção das diferentes concentrações (0,3 a 2,0mM), o qual é dissolvido em éter etílico. É adicionada 1 gota de fenolftaleína (como indicador de pH) a essa solução, que, em seguida, é titulada com o etilato de sódio até que fique rosa claro (pH básico), indicando a incorporação dos íons sódio às moléculas de ácido graxo. Posteriormente, todo o éter que havia sido utilizado para dissolver o ácido palmítico é evaporado com gás nitrogênio. O palmitato de sódio formado é então dissolvido em NaCl 0,12M sob aquecimento. Essa solução aquecida é adicionada a NaCl 0,12M, sob agitação, contendo 1% ou 2% de albumina, dependendo da concentração de ácido palmítico utilizada. É nesta fase que ocorre a ligação das moléculas de palmitato de sódio aos sítios da albumina. A solução de palmitato de sódio ligado à albumina era adicionada ao tampão Krebs-Ringer para ser utilizada nos experimentos de avaliação do efeito do ácido palmítico no metabolismo de proteínas de músculos esqueléticos incubados *in vitro*.

### **2.3.2) Efeito do ácido palmítico na proteólise total e na atividade das vias proteolíticas em músculo esquelético de ratos normais**

#### **I) Procedimento experimental para o estudo da proteólise**

Na manhã do experimento, os animais foram pesados e escolhidos aqueles com pesos entre 70g e 80g. Os músculos *soleus* e EDL foram incubados em tampão Krebs Ringer-bicarbonato (0,120M de NaCl, 0,015M de NaHCO<sub>3</sub>; 4,828mM de KCl; 1,2mM de MgSO<sub>4</sub>; 1,212mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,4mM de CaCl<sub>2</sub> - pH 7,4) contendo 5mM de glicose, 0,5mM de cicloheximida e albumina 1% a 2% livre de ácidos graxos ou ligada a diferentes concentrações de ácido palmítico (0,3 a 2,0 mM) e aerado com carbogênio (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>).

Para a medida da atividade proteolítica, os músculos íntegros foram fixados por meio dos seus tendões a suportes de alumínio (*soleus*) ou de acrílico (EDL), mantendo-os assim em seus comprimentos de repouso ("*stretch*"). A manutenção dos músculos nestas condições possibilita a difusão de oxigênio e nutrientes, evitando-se anóxia das fibras musculares centrais. A maioria dos experimentos foi realizada, no mínimo, duas vezes e o número de animais utilizados em cada grupo foi de 6 a 8.

## II) Avaliação da atividade proteolítica

Para a determinação da degradação de proteínas, os músculos foram incubados em meios adequados, aerados com carbogênio (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>), permanecendo por 1 hora em banho sob agitação constante a 37°C, a fim de estabelecer o equilíbrio da velocidade de liberação de tirosina para o meio de incubação. Após esse período de pré-incubação, os meios foram renovados com outro de idêntica composição por mais 2 horas de incubação. No final deste período, 1mL do meio foi coletado e adicionado a 0,25mL de ácido perclórico 1,5N para a determinação da tirosina liberada.

A atividade proteolítica foi estimada por meio da liberação de tirosina de proteínas de músculos incubados na presença de cicloheximida, que impede a reutilização dos aminoácidos para a síntese de proteínas. A tirosina é normalmente escolhida para a avaliação da proteólise, uma vez que não é um aminoácido oxidado nem sintetizado "de novo" pelo músculo. Além disso, a tirosina é facilmente determinada por meio de um método fluorimétrico simples e de grande sensibilidade, descrito por Waalkes & Udenfriend (1957). Essa liberação de tirosina deve refletir a velocidade de degradação de todas as classes de proteínas celulares, uma vez que este aminoácido é distribuído em todas as proteínas celulares (Jefferson *et al.*, 1977).

Em alguns experimentos, foi realizada a determinação de tirosina no "pool" muscular para assegurar-nos que a variação da concentração de tirosina livre no meio de incubação refletia sua concentração no "pool" intracelular. Para isso, ao final do período de incubação, os músculos foram lavados com água destilada, secos e colocados em 1ml de ácido tricloroacético 10% (TCA). Em seguida, foram homogeneizados com Politron, centrifugados a 3000rpm durante 15 minutos e 1ml do sobrenadante foi coletado para determinação de tirosina livre muscular.

## III) Procedimentos experimentais para a avaliação da atividade das vias proteolíticas

As seguintes vias proteolíticas foram estudadas no músculo esquelético *soleus*: via lisossomal, via dependente de cálcio (Ca<sup>2+</sup>), via dependente de ATP-ubiquitina(Ub)-proteassoma e via residual, na ausência ou na presença de ácido palmítico, seguindo os protocolos metodológicos descritos a seguir.

**a) via proteolítica lisossomal**

A quantificação da atividade proteolítica lisossomal foi feita através de método que utiliza a inibição desta via, com a adição ao meio de incubação de metilamina, aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA - leucina, isoleucina e valina) e insulina. A metilamina é uma base fraca que se acumula nos lisossomos, aumentando o pH intralisossomal para valores próximos à neutralidade, inibindo assim a atividade das catepsinas e hidrolases ácidas lisossomais (Mortimore, 1982; Kettelhut *et al.*, 1988). Os BCAA atuam através do bloqueio da formação de vacúolos autofágicos e também diminuindo a fragilidade lisossomal nos músculos esquelético e cardíaco e, portanto, inibindo a degradação protéica, sem alteração do conteúdo total de enzimas lisossomais (Rannels *et al.*, 1975; Jefferson *et al.*, 1977; Kettelhut *et al.*, 1988).

O esquema a seguir ilustra as condições de incubação dos músculos *soleus*:

**PROTOCOLO DA VIA LISOSSOMAL**


---

**MÚSCULOS (COM TENDÕES FIXOS A SUPORTES)  
RETIRADOS DAS 2 PATAS (1; 2)**

---

COMPONENTES DO MEIO	MÚSCULOS	
	1	2
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4)	+	+
Glicose (5mM)	+	+
Cicloheximida (0,5mM)	+	+
Albumina 1%	+	+
Metilamina (10mM)	-	+
Insulina (0,1U/ml)	-	+
BCAA*	-	+

---

\* leucina: 0,5mM; isoleucina: 0,85mM; valina: 1,0mM

A diferença entre a proteólise observada com os músculos 1 e 2 reflete a participação da via lisossomal. Vale a pena salientar que os valores de tirosina liberada para o meio de incubação do músculo 1 representam a atividade proteolítica “total” (embora haja uma relativa inibição da via dependente de cálcio devido ao estiramento do músculo com manutenção do seu comprimento de repouso, levando à inibição da entrada do íon).

Os aminoácidos liberados na degradação das proteínas celulares podem também ser utilizados na síntese protéica. Assim, para avaliar a degradação protéica total, a síntese foi bloqueada pela adição de 0,5 mM de cicloheximida, que bloqueia a síntese de proteínas por inibir a atividade peptidil transferase da subunidade ribossomal 60S. Essa concentração do inibidor acarreta redução de 95% na incorporação de  $^{14}\text{C}$ -Tyr em proteína, sendo linear por 3 horas, além de não afetar a atividade proteolítica (Fulks *et al.*, 1975). Por tal ação, a cicloheximida foi utilizada no estudo da determinação da atividade de todas as vias de degradação de proteínas.

#### **b) via proteolítica dependente de cálcio**

O estudo da participação do sistema proteolítico dependente de cálcio foi realizado utilizando-se dois tipos de protocolos. Em ambos, os músculos das duas patas foram incubados com seus tendões fixos a suportes em tampão Krebs Ringer-bicarbonato na presença de inibidores da via lisossomal (BCAA e metilamina). No protocolo 1, a pata 2 foi incubada na ausência de cálcio em meio acrescido de inibidores da via proteolítica dependente de cálcio, leupeptina e E64. O uso de E64 ou de leupeptina tem como função inibir as calpaínas, bem como as enzimas lisossomais. O cálcio, no meio de incubação, é fundamental para a atividade das calpaínas, enzimas que são dependentes desse íon, e sua retirada do meio é feita quando se pretende potencializar a ação de substâncias inibidoras das calpaínas.

No segundo protocolo utilizado, a pata 2 foi incubada na presença de ionóforo de cálcio. Os ionóforos de cálcio, como  $A_{23187}$ , determinam um aumento de 50 a 60% na concentração do íon cálcio intracelular. Esses valores são alcançados pela capacidade desse ionóforo de liberar cálcio dos estoques intramitocondriais (Blackmore *et al.*, 1978) e/ou do retículo sarcoplasmático (Rodemann *et al.*, 1982), assim como de aumentar o influxo desse íon do meio para o interior das células, o que leva à ativação das calpaínas e, por conseguinte, da degradação de proteínas (Kameyama & Etlinger, 1979; Furuno & Goldberg, 1986). Esse tratamento reflete a

capacidade proteolítica máxima da via dependente de cálcio no músculo (Kettelhut *et al.*, 1988). Os esquemas a seguir ilustram as condições de incubação dos músculos *soleus*.

### **PROTOCOLO 1 DA VIA DEPENDENTE DE CÁLCIO**

#### **MÚSCULOS (COM TENDÕES FIXOS A SUPORTES) RETIRADOS DAS 2 PATAS (1; 2)**

COMPONENTES DO MEIO	MÚSCULOS	
	1	2
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4)	+	+
Glicose (5mM)	+	+
Cicloheximida (0,5mM)	+	+
Albumina 1%	+	+
Metilamina (10mM)	+	+
BCAA*	+	+
Leupeptina (50µM)	-	+
E64 (25 µM)	-	+

\* leucina: 0,5mM; isoleucina: 0,85mM; valina: 1,0mM

**PROTOCOLO 2 DA VIA DEPENDENTE DE CÁLCIO**

**MÚSCULOS (COM TENDÕES FIXOS A SUPORTES)  
RETIRADOS DAS 2 PATAS (1; 2)**

COMPONENTES DO MEIO	MÚSCULOS	
	1	2
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4)	+	+
Glicose (5mM)	+	+
Cicloheximida (0,5mM)	+	+
Albumina 1%	+	+
Metilamina (10mM)	+	+
BCAA*	+	+
A <sub>23187</sub> (10µg/ml)	-	+
DMSO (1 µl/ml)**	+	+

\* leucina: 0,5mM; isoleucina: 0,85mM; valina: 1,0mM

\*\* Dimetilsulfóxido: usado para dissolver o ionóforo de cálcio

A diferença de proteólise observada entre os músculos 1 e 2 reflete a atividade máxima da via dependente de cálcio.

**c) via proteolítica dependente de ATP-Ub-proteassoma**

O estudo da participação do sistema proteolítico dependente de ATP-Ub-proteassoma foi realizado utilizando-se dois tipos de protocolos. No primeiro, os músculos foram incubados com seus tendões fixos a suportes em meio isento de cálcio, contendo E64 e leupeptina (bloqueio da via proteolítica dependente de cálcio) e metilamina e BCAA (acrescentados com a finalidade de bloquear a via proteolítica lisossomal). O músculo na presença de dinitrofenol (0,5mM de DNP) e ausência de glicose apresenta 95% de depleção do seu conteúdo de ATP tecidual por inibição da fosforilação oxidativa e glicólise (Kettelhut *et al.*, 1988). O músculo nestas condições

apresenta uma grande queda na degradação de proteínas (Goldberg & St. John, 1976; Ciechanover, 1987). A ausência de cálcio no meio de incubação é fundamental para a observação de tal achado, pois músculos depletados de ATP, se incubados em meio contendo cálcio, apresentam aumento do influxo e acúmulo intracelular desse íon, que ativa as proteases dependentes de cálcio, provocando aumento da proteólise. Nestas condições, portanto, pode ser avaliada a participação da via dependente de ATP-Ub-proteassoma.

Pela medida da diferença entre a proteólise observada no músculo da pata 1 (que seria a proteólise não lisossomal e não dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ ), a qual chamamos de "basal" e a proteólise observada no músculo da pata 2, na ausência de ATP (que seria a proteólise residual independente de energia), é possível quantificar com reprodutibilidade o processo proteolítico dependente de ATP.

O segundo tipo de protocolo utilizado para estimar a participação desta via baseou-se na inibição direta da atividade proteolítica do proteassoma com o uso do inibidor MG132 (N-carboxibenzoxi-Leu-Leu-Leucinal). O MG132 é um peptídeo aldeído que inibe a atividade proteolítica do proteassoma sem afetar as atividades ATPásicas ou isopeptidásicas do complexo enzimático. Vale a pena ressaltar que este estudo foi realizado com a via cálcio não inibida e com a via lisossomal inibida tal como descrito anteriormente. Com este protocolo, pode ser estimada a contribuição da atividade proteolítica do proteassoma.

Pouco se conhece a respeito do controle, quais são as enzimas responsáveis e os substratos que fazem parte do processo proteolítico residual. A proteólise residual é aquela que permanece quando as três outras vias estão bloqueadas. Assim sendo, corresponde à proteólise encontrada na pata 2 do protocolo 1 descrito a seguir.

**PROCOLO 1 DA VIA DEPENDENTE DE ATP-PROTEASSOMA****MÚSCULOS (COM TENDÕES FIXOS A SUPORTES)****RETIRADOS DAS 2 PATAS (1; 2)**

COMPONENTES DO MEIO	MÚSCULOS	
	1	2
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4)	+	+
Glicose (5mM)	+	-
Cicloheximida (0,5mM)	+	+
Albumina 1%	+	+
Metilamina (10mM)	+	+
BCAA*	+	+
E64 (25µM); Leupeptina (50µM)	+	+
Dinitrofenol (0,5mM)	-	+

\* leucina: 0,5mM; isoleucina: 0,85mM; valina: 1,0mM

**PROCOLO 2 DA VIA DEPENDENTE DE ATP-PROTEASSOMA**

**MÚSCULOS (COM TENDÕES FIXOS A SUPORTES)  
RETIRADOS DAS 2 PATAS (1; 2)**

COMPONENTES DO MEIO	MÚSCULOS	
	1	2
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4)	+	+
Glicose (5mM)	+	+
Cicloheximida (0,5mM)	+	+
Albumina 1%	+	+
Metilamina (10mM)	+	+
BCAA*	+	+
MG132 (20µM)	-	+

\* leucina: 0,5mM; isoleucina: 0,85mM; valina: 1,0mM

**2.3.3) Efeito da inibição da oxidação do ácido palmítico na atividade proteolítica total em músculo esquelético de ratos jovens**

Com o objetivo de avaliar se os ácidos graxos devem necessariamente ser oxidados para exercer seu efeito antiproteolítico, músculos *soleus* de ratos normais foram pré-incubados por 1 hora em meios na ausência e na presença de 1,0mM de ácido palmítico e de inibidores da oxidação de ácidos graxos: 1) Etomoxir 75µM, 2) Dicloroacetato 3mM ou a associação de ambos. Etomoxir é um inibidor da carnitina aciltransferase-1 (CAT-1) mitocondrial, o que bloqueia a reação entre os ácidos graxos e a carnitina e, por consequência, inibe a entrada dos ácidos graxos para o interior da mitocôndria; apresenta uso clínico, como agente terapêutico no diabetes tipo 2 (Morillas *et al.*, 2000; Rupp *et al.*, 2002). Dicloroacetato é um inibidor da piruvato desidrogenase quinase (PDHK), que, por sua vez, é o inibidor da enzima piruvato desidrogenase. A PDHK, ficando inibida, não fosforila a piruvato desidrogenase e, assim, a enzima fica ativa, aumentando a produção de acetil-CoA

e de malonil-CoA, que inibe a CAT-1, reduzindo a entrada de ácidos graxos na mitocôndria para serem oxidados (Alam & Saggerson, 1998).

### **COMPOSIÇÃO DO MEIO DE INCUBAÇÃO**

#### **MÚSCULOS (COM TENDÕES FIXOS A SUPORTES) RETIRADOS DAS 2 PATAS (1; 2)**

COMPONENTES DO MEIO	MÚSCULOS			
	- Ácido palmítico	+ [1- <sup>14</sup> C]Ácido palmítico (3μCi/ml; 1,0mM)		
	1	2	1	2
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4)	+	+	+	+
Glicose (5mM)	+	+	+	+
Cicloheximida (0,5mM)	+	+	+	+
Albumina 1%	+	+	+	+
Etomoxir (75μM)	-	+	-	+
Dicloroacetato (3mM)	-	-	+	+

\* leucina: 0,5mM; isoleucina: 0,85mM; valina: 1,0mM

Após esse período, procedeu-se à troca do meio contendo ácido palmítico frio por um de igual constituição contendo também ácido palmítico marcado com <sup>14</sup>C (3μCi/ml). Os frascos com os músculos foram fechados com rolhas de borracha contendo um coletor de plástico com papel de filtro sanfonado (Whatman nº 1 de 3x1cm) no seu interior, no qual adicionou-se 0,25ml de hiamina (para captar o CO<sub>2</sub> liberado pelo músculo no meio de incubação) e processou-se a incubação por 2 horas a 37 °C sob agitação constante. Ao final do período de incubação, foi coletado 1ml do meio com uma agulha longa (sem retirar a rolha de borracha) para a determinação da Tyr liberada e avaliação da atividade proteolítica. Imediatamente após tal procedimento, foi injetado ácido sulfúrico 6N (0,25ml) pela rolha de borracha no compartimento principal do frasco, a fim de

reduzir o pH, interromper as reações tissulares e favorecer a captação de CO<sub>2</sub> produzido.

Aguardou-se de 1 a 2 horas para que todo o CO<sub>2</sub> fosse adsorvido pela hiamina no coletor de plástico e então a rolha de borracha foi retirada. Foram colocadas 2 a 3 gotas de metanol (para aumentar a dissolução da hiamina) no coletor, o qual foi transferido para um frasco contendo 10ml de coquetel de cintilação biodegradável (ScintiSafe Econo 1) para contagem da radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB 2100TR, Packard BioScience Company).

#### **2.3.4) Efeito do 2-bromopalmitato (ácido graxo não metabolizável) na atividade proteolítica total em músculo esquelético de ratos jovens**

Músculos *soleus* de ratos normais foram incubados por 2 horas na ausência e na presença de 1,0mM de 2-bromopalmitato ligado à albumina 1%. O 2-bromopalmitato é um análogo de ácido graxo geralmente empregado para avaliar a utilização de ácidos graxos por determinado tecido. O 2-bromopalmitato pode se ligar à albumina e à proteína de ligação aos ácidos graxos (FABP) no citosol e é substrato para o processo de acilação, ou seja, é ativado pela acil-CoA sintetase. No entanto, não é substrato para a  $\beta$ -oxidação na mitocôndria ou nos peroxissomos e é usado em doses farmacológicas para inibir a oxidação dos ácidos graxos. Acredita-se que essa ação seja devida a uma interação eficientemente irreversível do 2-bromopalmitoil-CoA com a CAT-1, o que bloqueia o transporte dos acil-CoAs graxos de cadeia longa para o interior da mitocôndria (Oakes *et al.*, 1999). Assim, o uso deste análogo do ácido palmítico é uma ferramenta importante para verificar se o efeito observado dos ácidos graxos em determinado processo metabólico (no caso, na degradação de proteínas musculares) depende ou não de sua oxidação.

#### **2.3.5) Efeito do ácido palmítico na proteólise total em músculo esquelético de ratos diabéticos**

A avaliação da degradação de proteínas foi realizada em músculos *soleus* de ratos normais e diabéticos incubados na presença de ácido palmítico. Foram utilizados grupos de animais submetidos a diferentes períodos de diabetes (1, 3, 5 e 10 dias após administração de STZ), de acordo com Pepato *et al.* (1996).

Na manhã do experimento, os animais diabéticos e os normais foram pesados e escolhidos aqueles com pesos próximos entre 70g a 80g. O sacrifício foi realizado por deslocamento cervical numa seqüência alternada entre os grupos (a seqüência obedecida era um animal normal e um diabético), removendo-se rapidamente os dois músculos *soleus*, que foram pesados e um deles incubado na ausência e o outro na presença de 1,0mM de ácido palmítico. Após o período de incubação de 2 horas, foi medida a liberação de tirosina no meio para quantificação da atividade proteolítica total.

### **2.3.6) Efeito do ácido palmítico e de inibidores de sua oxidação na síntese total de proteínas em músculo esquelético de ratos normais**

Músculos *soleus* de ratos normais foram incubados com seus tendões fixos a suportes apropriados para manutenção dos seus comprimentos de repouso, em tampão Krebs Ringer-bicarbonato, contendo glicose (5 mM) e os vinte aminoácidos, em concentrações semelhantes às encontradas no plasma de ratos, conforme apresentadas na Tabela I, além de albumina 1% livre ou ligada a ácido palmítico 1,0mM e de inibidores da oxidação de ácidos graxos, Etomoxir 75µM e Dicloroacetato 7mM. Vale a pena ressaltar que 15 aminoácidos são pesados e utilizados para preparo de uma solução estoque que permanece acondicionada em *freezer*. Os outros cinco aminoácidos, asparagina, cisteína, metionina, glutamina e tirosina, mais susceptíveis à oxidação, são pesados e adicionados ao meio no dia do experimento. As tabelas a seguir ilustram as condições de incubação dos músculos *soleus*.

**Tabela I** - Aminoácidos (AA) adicionados ao meio de incubação (Scharff & Wool, 1966) para avaliação da velocidade de síntese protéica total.

<b>Aminoácido</b>	<b>Concentração (mM)</b>	<b>Aminoácido</b>	<b>Concentração (mM)</b>
Ác. aspártico	0,035	Isoleucina	0,100
Ác. glutâmico	0,174	Leucina	0,170
Alanina	0,450	Lisina	0,400
Arginina	0,200	Metionina	0,070
Asparagina	0,061	Prolina	0,180
Cisteína	0,070	Serina	0,280
Fenilalanina	0,500	Tirosina	0,100
Glicina	0,400	Treonina	0,300
Glutamina	0,350	Triptofano	0,070
Histidina	0,080	Valina	0,200

**PROTOCOLO DA SÍNTESE PROTÉICA****MÚSCULOS (COM TENDÕES FIXOS A SUPORTES)****RETIRADOS DAS 2 PATAS (1; 2)**

COMPONENTES DO MEIO	MÚSCULOS			
	- Ácido palmítico		+ Ácido palmítico 1,0mM	
	1	2	1	2
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4)	+	+	+	+
Glicose (5mM)	+	+	+	+
20 AA Tabela I	+	+	+	+
Albumina 1%	+	+	+	+
Etomoxir (75µM)	-	-	-	+
Dicloroacetato (7mM)	-	-	-	+

\* leucina: 0,5mM; isoleucina: 0,85mM; valina: 1,0mM

Uma vez que a tirosina (0,1mM) também é adicionada ao meio de incubação para medida da síntese total de proteínas, não é possível usar o mesmo músculo para avaliação da degradação protéica simultaneamente, pois a proteólise é estimada pela medida da tirosina liberada (como já explicado anteriormente) e o método não tem sensibilidade para detectar essas diferenças.

Após 1 hora de pré-incubação, o meio foi substituído por outro idêntico, acrescido de tirosina marcada com  $^{14}\text{C}$  ( $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Tyr}$ ; 0,05  $\mu\text{Ci/mL}$ ), permanecendo os músculos incubados por mais um período de 2 horas. Em seguida, os músculos foram removidos de seus suportes e lavados com água destilada fria, secos em papel de filtro e colocados em 2mL de TCA 10%. Após homogeneização e centrifugação a 1800g por 10 minutos, 1mL do sobrenadante foi utilizado para a avaliação da tirosina livre total no músculo e uma alíquota de 100µL, usada na medida da radioatividade, para determinação da atividade específica da tirosina de cada músculo separadamente. Posteriormente o precipitado de proteínas foi lavado

3 vezes com 2mL de TCA 10%. A dissolução do precipitado final foi obtida pela adição de 1mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, à temperatura ambiente por 12 horas ou em banho-maria a 40°C por 2 horas. A seguir, foram adicionados 8mL de coquetel de cintilação para contagem da radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB 2100TR, Packard BioScience Company).

## **2.4) Estudo *in vitro* do papel do $\beta$ -OH butirato no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos normais**

### **2.4.1) Avaliação da atividade proteolítica total**

Para verificar o efeito dos corpos cetônicos na atividade proteolítica total de músculos esqueléticos de ratos jovens, foram realizados experimentos de avaliação da liberação de tirosina em músculos *soleus* de ratos normais, incubados na presença de diferentes concentrações de  $\beta$ -OH butirato (2,0; 4,0; 6,0 e 10,0 mM) e em músculos EDL incubados na presença de  $\beta$ -OH butirato 2,0mM.

### **2.4.2) Avaliação da atividade das vias proteolíticas**

As seguintes vias proteolíticas foram estudadas no músculo esquelético *soleus* de ratos normais: via lisossomal, via dependente de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), via dependente de ATP-ubiquitina(Ub)-proteassoma e via residual, na ausência ou na presença de  $\beta$ -OH butirato 2,0mM, seguindo os protocolos metodológicos idênticos aos utilizados com ácido palmítico, com a diferença de que um dos protocolos empregados para o estudo do processo proteolítico dependente de cálcio foi a incubação dos músculos na presença de inibidores da via lisossomal, sendo que o músculo de uma pata era incubado de forma livre ("*free*"), favorecendo a entrada de íons cálcio nas células e ativando-se assim as calpaínas, e o músculo da outra pata era incubado com seus tendões fixos aos suportes adequados ("*stretch*"), situação que bloqueia a entrada do cálcio, ocorrendo assim inibição da via proteolítica estudada. A diferença da proteólise avaliada nos dois músculos é uma estimativa da participação da via dependente de cálcio. O outro tipo de protocolo de estudo dessa via é aquele que utiliza inibidores das calpaínas, já descrito anteriormente.

### **2.4.3) Avaliação da síntese total de proteínas**

Os músculos *soleus* de ratos normais foram incubados com seus tendões fixos a suportes apropriados para manutenção dos seus comprimentos de repouso, em tampão Krebs Ringer-bicarbonato, contendo glicose (5 mM) e todos os vinte aminoácidos, em concentrações semelhantes às encontradas no plasma de ratos, conforme apresentadas na Tabela I, além de  $\beta$ -OH butirato (2,0mM) na pata 2.

Após 1 hora de pré-incubação, o meio foi substituído por outro idêntico, acrescido de tirosina marcada com  $^{14}\text{C}$  ([U- $^{14}\text{C}$ ]Tyr; 0,05  $\mu\text{Ci/mL}$ ), permanecendo os músculos incubados por mais um período de 2 horas. Em seguida, foi seguido o mesmo protocolo descrito anteriormente para avaliação da síntese protéica total.

## **2.5) Estudo do efeito da redução dos níveis plasmáticos de AGL na proteólise total em músculos diafragma de ratos diabéticos**

Com o objetivo de avaliar o efeito *in vivo* da redução dos níveis plasmáticos de AGLs na atividade proteolítica total em músculo esquelético, foram utilizados diafragmas de ratos adultos (200-220g) tratados com ácido nicotínico (150mg/kg peso, ip), um potente inibidor da lipólise no tecido adiposo (Carlson, 2005). Esses animais foram escolhidos porque possuem depósitos maiores de tecido adiposo. Na manhã do experimento, os animais diabéticos (5 dias pós-aloxana) e os normais foram pesados e escolhidos aqueles com pesos entre 200g e 220g. O ácido nicotínico foi dissolvido em salina 0,9% e o pH da solução foi ajustado para 7,0 com NaOH para completa dissolução. Foram administradas injeções intraperitoniais na concentração de 150mg de ácido nicotínico/kg de peso corporal a cada 2 horas. O tratamento dos animais com ácido nicotínico ou salina foi iniciado 4 horas e 30 minutos antes da retirada dos músculos. Assim, para determinação da proteólise, foram conduzidos quatro grupos de animais: normal tratado com salina (NS); normal tratado com ácido nicotínico (NAN); diabético tratado com salina (DS) e diabético tratado com ácido nicotínico (DAN).

### **2.5.1) Avaliação da atividade proteolítica total**

Os experimentos para determinação da proteólise nos músculos esqueléticos de animais dos grupos citados anteriormente foram conduzidos após cerca de 5 horas do início do tratamento com ácido nicotínico. O sacrifício dos

animais foi realizado por decapitação para coleta do sangue, numa seqüência alternada entre os grupos. A retirada dos músculos foi iniciada 30 minutos após a última administração de ácido nicotínico. O músculo de escolha para estudo da proteólise nesses animais adultos foi o diafragma, por ser um tecido delgado e, desta forma, permitir a difusão adequada de oxigênio e nutrientes provenientes do meio de incubação e também porque reflete com facilidade as alterações ocorridas na atividade proteolítica corporal total dos animais. Os músculos diafragma foram incubados de forma livre em meio Krebs-Ringer bicarbonato contendo 5mM de glicose e 0,5mM de cicloheximida. A atividade proteolítica foi estimada por meio da liberação de tirosina de proteínas de músculos incubados após um período de 2 horas.

## **2.6) Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) ou como médias percentuais  $\pm$  EPM dos grupos experimentais em relação ao grupo controle (considerado como 100%). Para a análise estatística dos resultados entre os grupos foi empregado o teste *t* de Student e níveis de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **2.7) Reagentes**

Os reagentes utilizados nos diferentes experimentos foram obtidos dos laboratórios Sigma Chemicals, Calbiochem EMD Biosciences, Amersham Biosciences, Roche, Merck, New England Nuclear, Pierce Co, Peptides International, Alexis Biochemicals, Promega e Invitrogen Life Technologies.

## ***RESULTADOS***

---

### 3) Resultados

#### A) Experimentos *in vitro*

##### 3.1) Efeito do ácido palmítico na proteólise total e na atividade das vias proteolíticas em músculo esquelético de ratos jovens normais

O presente trabalho investigou o papel dos ácidos graxos livres no metabolismo protéico muscular de ratos. Esses estudos avaliaram o efeito de diferentes concentrações de ácido palmítico na proteólise total de músculos *soleus* e EDL de ratos normais. Além disso, foram estudadas as alterações ocorridas nas atividades das vias proteolíticas lisossomal, dependente de cálcio, dependente de ATP-Ub-proteassoma e residual em músculo *soleus* nas mesmas condições.

##### a) Proteólise total em *soleus* e EDL de ratos normais

Na Tabela 1, estão apresentados os valores de tirosina liberada de músculos *soleus* e EDL incubados na ausência e na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico. De forma semelhante, a Figura 1 apresenta os valores de proteólise total (expressos como percentuais médios em relação aos controles, cujos músculos foram incubados na ausência de ácido palmítico, considerados como 100%) de *soleus* de animais normais cujos músculos foram incubados na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico. A queda mais acentuada na atividade proteolítica total foi de aproximadamente 29%, encontrada nos músculos incubados com ácido palmítico na concentração de 1,0mM. Nas concentrações de 0,3, 0,6 e 2mM, houve uma queda significativa na atividade proteolítica de cerca de 11%, 17% e 20% respectivamente. Foram também realizados experimentos com músculos *soleus* incubados nas mesmas condições descritas em Materiais e Métodos, na presença de ácido palmítico 1,0mM, porém na ausência de glicose. Foi observado que mesmo na ausência de glicose, o ácido palmítico promoveu uma redução semelhante na degradação de proteínas musculares de ratos normais.

Os valores percentuais de proteólise obtidos de músculos EDL de ratos normais incubados na presença de diferentes concentrações de ácido palmítico encontram-se na Figura 2. Foi observada uma queda na proteólise em músculos EDL incubados na presença de ácido palmítico nas concentrações de 0,3 e 1,0mM (12% e 18% respectivamente).

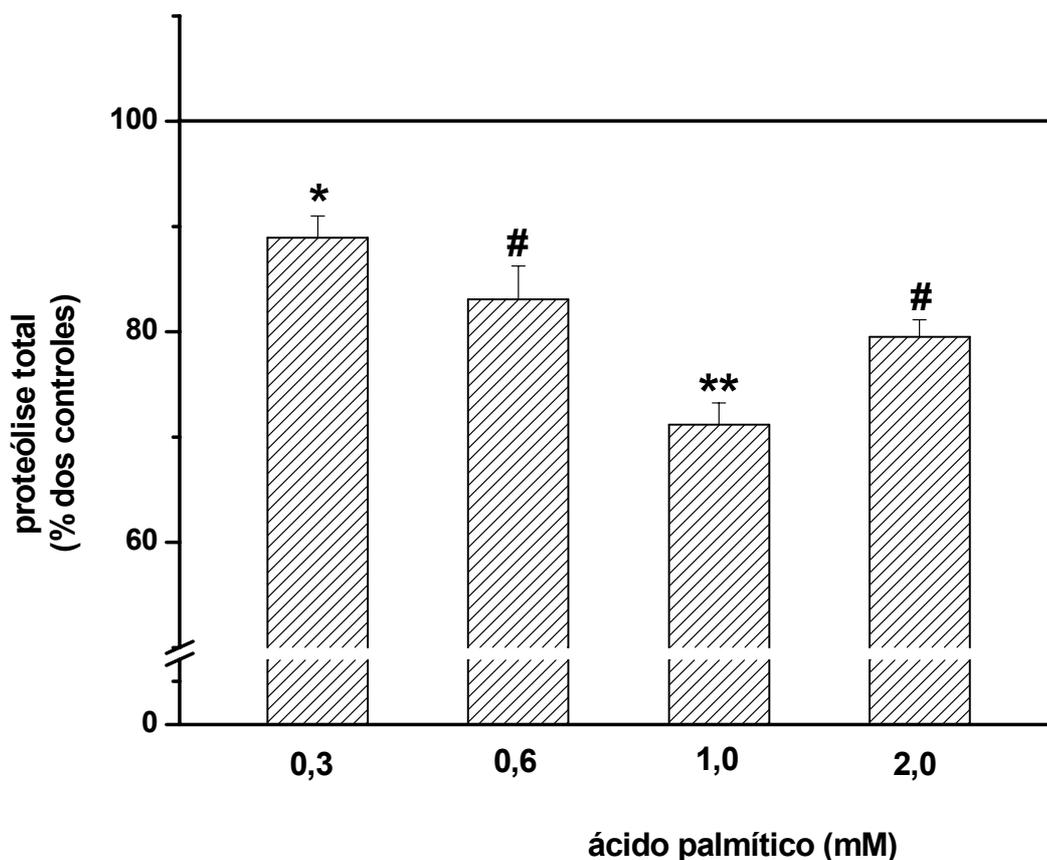
Com o objetivo de verificar se na presença de ácido palmítico, a redução do conteúdo de tirosina liberada no meio não era decorrente de alteração no “pool” intracelular de tirosina livre, músculos de ratos normais foram incubados na ausência e na presença de ácido palmítico 1,0mM. Comparando-se os valores de tirosina liberada (nmol Tyr/mg.2h) no meio de incubação de músculos *soleus* que foram incubados nas condições descritas ( $0,340 \pm 0,014$  vs  $0,242 \pm 0,007$ ) com a somatória desses valores e dos da tirosina intramuscular ( $0,134 \pm 0,008$  vs  $0,129 \pm 0,005$ ) desses músculos nas mesmas condições ( $0,474 \pm 0,012$  vs  $0,371 \pm 0,009$ ), é possível observar o efeito de redução da proteólise pelo ácido palmítico, indicando que a variação da concentração de tirosina livre no meio de incubação reflete seu comportamento no “pool” intracelular.

Além disso, para verificar se o efeito antiproteolítico do ácido palmítico era observado mesmo na ausência de inibição da síntese de proteínas, experimentos foram realizados com músculos *soleus* incubados na presença de ácido palmítico 1,0mM e na ausência de cicloheximida, encontrando-se redução significativa na proteólise total semelhante àquela obtida na presença de cicloheximida, tendo sido encontrados valores (nmol Tyr/mg.2h) de  $0,379 \pm 0,014$  vs  $0,276 \pm 0,006$  na presença de ácido palmítico.

**Tabela 1:** Efeito *in vitro* de diferentes concentrações de ácido palmítico na **proteólise total** (nmol de Tyr liberada/mg.2h) de músculos *soleus* e EDL de ratos normais.

Proteólise total (nmol/mg.2h)			
Ácido palmítico (mM)	(-)	(+)	Diferença (%)
<u><i>soleus</i></u>			
0,3	$0,244 \pm 0,008$	$0,217 \pm 0,005$	- 11 *
0,6	$0,189 \pm 0,006$	$0,157 \pm 0,005$	- 17 #
1,0	$0,340 \pm 0,014$	$0,242 \pm 0,007$	- 29 **
2,0	$0,366 \pm 0,015$	$0,291 \pm 0,006$	- 20 #
<u>EDL</u>			
0,3	$0,401 \pm 0,008$	$0,352 \pm 0,011$	- 12 #
1,0	$0,277 \pm 0,013$	$0,226 \pm 0,006$	- 18 #

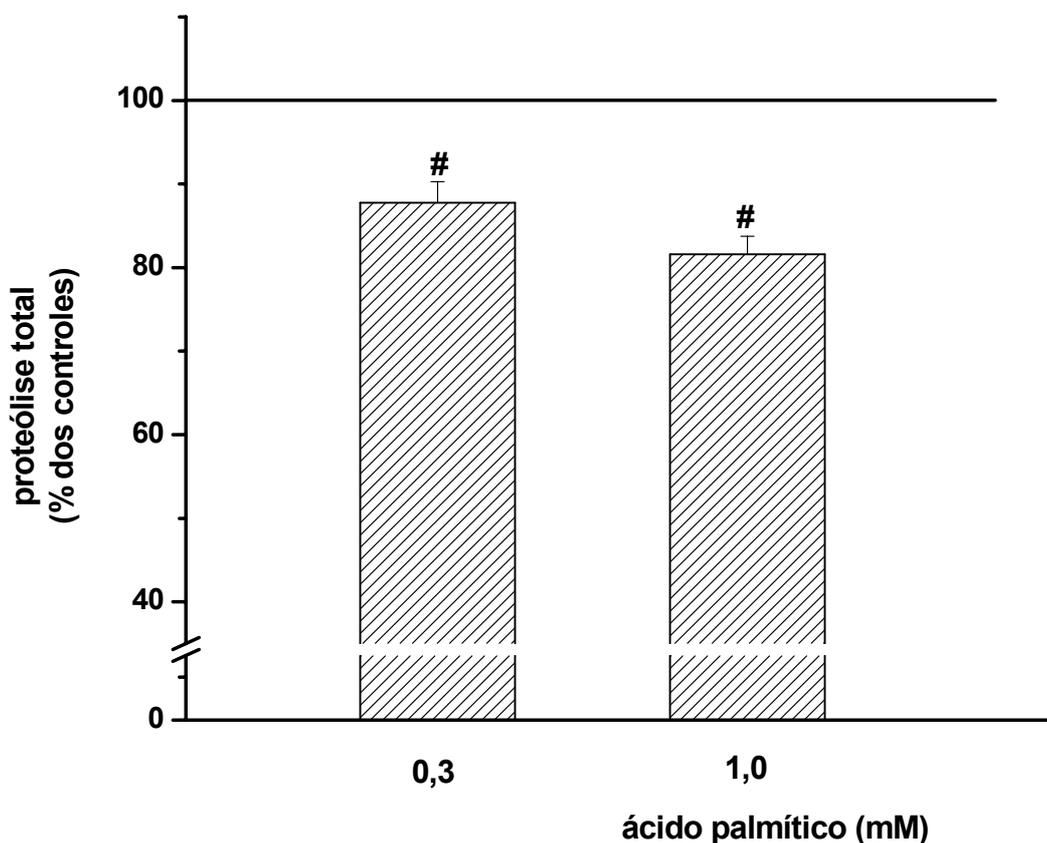
Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 a 10 músculos. ns: não significativo; \*  $p < 0,05$ ; #  $p < 0,005$  e \*\*  $p < 0,0005$  (ácido palmítico vs controle).

**Soleus**

Fi

**gura 1:** Efeito de diferentes concentrações de ácido palmítico na **proteólise total** em músculos **soleus** de ratos normais. Os resultados são expressos como médias percentuais  $\pm$  EPM dos músculos na presença de ácido palmítico em relação aos músculos controles (considerados como 100%), cujos valores absolutos estão apresentados na Tabela 1. Os valores foram obtidos de 6 a 10 músculos por grupo e representam um experimento típico, que foi repetido pelo menos 2 vezes, tendo sido obtidos resultados semelhantes. \*  $p < 0,05$ ; #  $p < 0,005$  e \*\*  $p < 0,0005$  (ácido palmítico vs controle).

## EDL



**Figura 2:** Efeito de diferentes concentrações de ácido palmítico na **proteólise total** em músculos **EDL** de ratos normais. Os resultados são expressos como médias percentuais  $\pm$  EPM dos músculos na presença de ácido palmítico em relação aos músculos controles (considerados como 100%), cujos valores absolutos estão apresentados na Tabela 1. Os valores foram obtidos de 6 a 8 músculos por grupo e representam um experimento típico, que foi repetido pelo menos 2 vezes, tendo sido obtidos resultados semelhantes. #  $p \leq 0,005$  (ácido palmítico vs controle).

### b) Participação das vias proteolíticas em *soleus* de ratos normais

Com a demonstração das alterações ocorridas na proteólise total em músculos *soleus* e EDL incubados com diferentes concentrações de ácido palmítico, o presente trabalho passou a investigar qual(is) via(s) proteolítica(s) estaria(m) contribuindo para estas respostas. Assim, foram estudadas as participações das vias proteolíticas lisossomal, dependente de cálcio, dependente de ATP-Ub-proteassoma e residual em *soleus* incubados na presença de ácido palmítico 1,0mM, já que esse tipo de músculo e essa concentração de ácido palmítico forneceram as respostas mais evidentes.

Na Tabela 2, estão sumarizados os valores médios da contribuição da via lisossomal nos músculos *soleus* incubados na ausência e na presença de ácido palmítico 1,0mM. Observa-se que não há diferença nos valores referentes à participação dessa via proteolítica na presença de ácido palmítico em relação aos controles. Por outro lado, na presença dos inibidores dessa via, observa-se uma redução dos valores de tirosina liberada pelos músculos incubados na presença do ácido palmítico, indicando que sua resposta anti-proteolítica pode ser mediada pela atividade das outras vias. Ainda por análise dessa Tabela, os valores médios da proteólise total podem ser avaliados pelos resultados obtidos na ausência de inibidores da via, representados pelo sinal (-).

Na Tabela 3, são apresentados os valores médios da participação da via dependente de ATP-Ub-proteassoma e da via residual, mostrando não ocorrer alterações na atividade dessas vias em músculos incubados na presença de ácido palmítico.

**Tabela 2:** Tirosina liberada no meio (nmol/mg.2h) pelos músculos *soleus* de ratos normais, incubados na ausência e na presença de ácido palmítico 1,0mM.

Tirosina liberada (nmol/mg.2h)			
Adição	Ácido palmítico		Diferença (%)
BCAA e metilamina	(-)	(+)	
(-)	0,418 ± 0,008	0,337 ± 0,015	- 20 #
(+)	0,340 ± 0,009	0,272 ± 0,006	- 20 #
componente lisossomal	0,078 ± 0,09 #	0,065 ± 0,014 #	ns

Os valores representam a média ± EPM de 7 a 8 músculos. ns: não significativo; # p < 0,005 em relação à ausência do ácido palmítico ou dos inibidores da via.

**Tabela 3:** Tirosina liberada no meio (nmol/mg.2h) pelos músculos *soleus* de ratos normais, incubados na ausência e na presença de ácido palmítico 1,0mM.

Tirosina liberada (nmol/mg.2h)				
Adição		Ácido palmítico		Diferença (%)
DNP	glicose	(-)	(+)	
(-)	(+)	0,363 ± 0,013	0,346 ± 0,006	ns
(+)	(-)	0,118 ± 0,014	0,110 ± 0,007	ns
componente dep. ATP-Ub-proteassoma		0,245 ± 0,003 #	0,236 ± 0,009 #	ns

Os valores representam a média ± EPM de 7 a 8 músculos. ns: não significativo; # p < 0,005 em relação à ausência dos inibidores da via.

Em relação à contribuição da via dependente de cálcio, os valores médios em *soleus* nas mesmas condições são apresentados nas Tabelas 4 e 5 e foram obtidos pelos protocolos que utilizaram inibidores de calpaínas e ionóforo de cálcio respectivamente. Pode-se verificar que nos dois tipos de protocolos utilizados, houve uma redução significativa na participação da via proteolítica dependente de cálcio de 55% e 49% respectivamente nos músculos incubados na presença de ácido palmítico.

**Tabela 4:** Tirosina liberada no meio (nmol/mg.2h) pelos músculos *soleus* de ratos normais, incubados na ausência e na presença de ácido palmítico 1,0mM.

Tirosina liberada (nmol/mg.2h)				
Adição		Ácido palmítico		Diferença (%)
BCAA e metilamina	E64 e leupeptina	(-)	(+)	
(+)	(-)	0,447 ± 0,017	0,268 ± 0,012	- 40 **
(+)	(+)	0,300 ± 0,02	0,201 ± 0,009	- 30 #
componente dep. cálcio		0,147 ± 0,021 #	0,067 ± 0,01 #	- 55 #

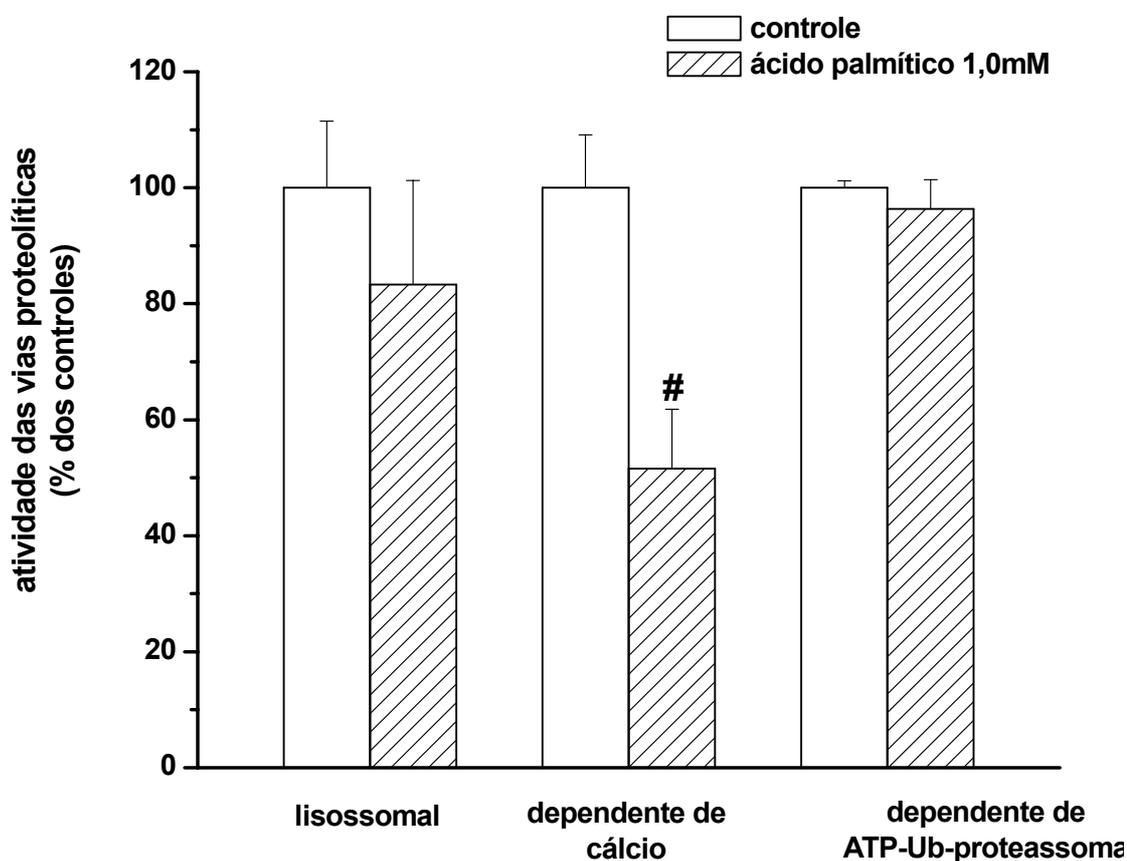
Os valores representam a média ± EPM de 7 a 8 músculos. ns: não significativo; \*\* p < 0,0005 e # p < 0,005 em relação à ausência do ácido palmítico ou dos inibidores da via.

**Tabela 5:** Tirosina liberada no meio (nmol/mg.2h) pelos músculos *soleus* de ratos normais, incubados na ausência e na presença de ácido palmítico 1,0mM.

Tirosina liberada (nmol/mg.2h)				
Adição		Ácido palmítico		Diferença (%)
BCAA e metilamina	A <sub>23187</sub>	(-)	(+)	
(+)	(-)	0,454 ± 0,023	0,297 ± 0,01	- 34 #
(+)	(+)	0,639 ± 0,017	0,392 ± 0,019	- 44 #
componente dep. cálcio		0,185 ± 0,017 #	0,095 ± 0,019 #	- 49 #

Os valores representam a média ± EPM de 7 a 8 músculos. ns: não significativo; # p < 0,005 em relação à ausência do ácido palmítico ou do ionóforo de cálcio.

A Figura 3 resume os valores médios percentuais da participação das vias proteolíticas em *soleus* de animais normais e que foram incubados com ácido palmítico 1,0mM em relação ao grupo incubado na ausência de ácidos graxos. Como visto anteriormente, a presença de ácido palmítico no meio de incubação não provoca nenhuma alteração na atividade das vias lisossomal e dependente de ATP-Ub-proteassoma nesse músculo. No entanto, os resultados mostram ocorrer uma redução significativa de aproximadamente 50% na participação da via proteolítica dependente de cálcio nos músculos incubados com ácido palmítico 1,0mM em relação ao grupo controle.



**Figura 3:** Efeito do ácido palmítico (1,0mM) na atividade das **vias proteolíticas** (lisossomal, dependente de cálcio e dependente de ATP-Ub-proteassoma) em músculos **soleus** de ratos normais. Os resultados são expressos como médias percentuais  $\pm$  EPM da participação das vias na presença de ácido palmítico em relação ao grupo controle (considerado como 100%). Os valores foram obtidos de 6 a 8 músculos por grupo e representam um experimento típico, que foi repetido pelo menos 2 vezes, tendo sido obtido resultados semelhantes. #  $p \leq 0,005$  (ácido palmítico vs controle).

### 3.2) Efeito do 2-bromopalmitato (ácido graxo não metabolizado) e da inibição da oxidação do ácido palmítico na proteólise total em *soleus* de ratos jovens

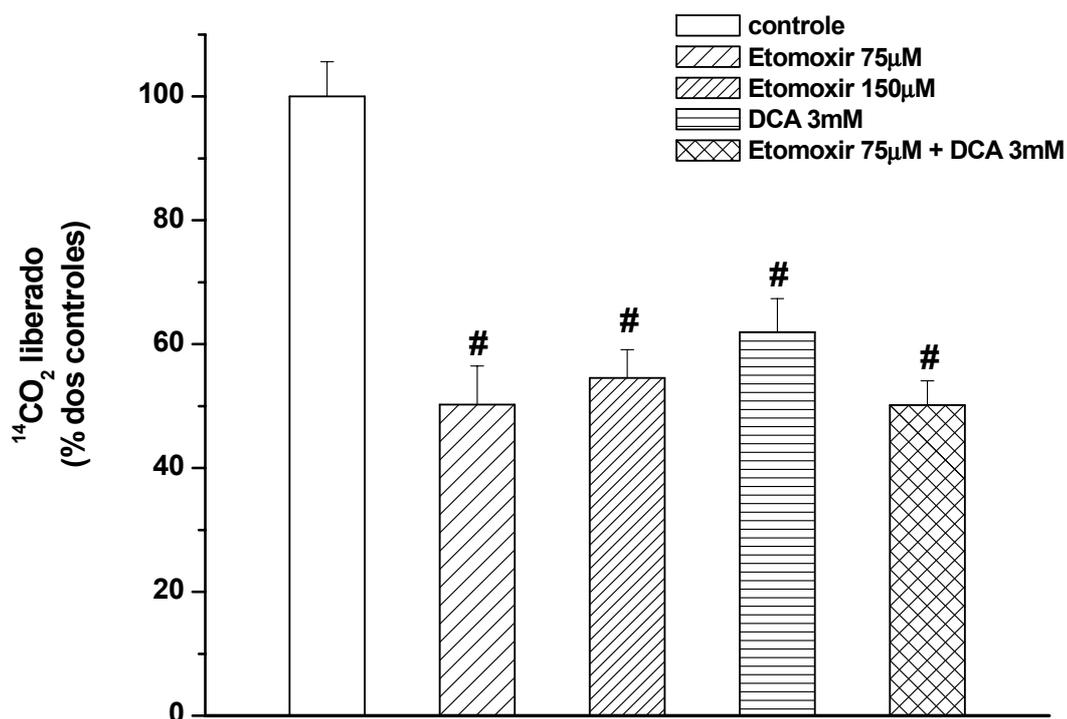
Com o objetivo de verificar se o efeito antiproteolítico dos ácidos graxos seria dependente de sua oxidação mitocondrial, o presente trabalho se propôs a estudar o efeito da inibição da oxidação do ácido palmítico pela utilização de Etomoxir e DCA e o efeito de ácidos graxos que não podem ser  $\beta$ -oxidados, como por exemplo, o 2-bromopalmitato, na proteólise total em *soleus* de animais normais.

A Tabela 6 apresenta os valores médios de liberação de  $^{14}\text{CO}_2$  formado pela oxidação de ácido palmítico na ausência e na presença de diferentes concentrações de inibidores de sua oxidação, Etomoxir e DCA. Os valores percentuais de inibição em relação ao grupo controle (na ausência de inibidores) são mostrados na Figura 4. Foram encontrados valores semelhantes de redução da liberação de  $^{14}\text{CO}_2$  pela oxidação do ácido palmítico, sendo de aproximadamente 40-50% para todas as concentrações e combinações utilizadas, não havendo inibição adicional quando se utilizava maior concentração de Etomoxir ou a associação de ambos os inibidores (Etomoxir e Dicloroacetato).

**Tabela 6:** Liberação de  $^{14}\text{CO}_2$  ( $\times 10^{-4} \mu\text{mol/mg.2h}$ ) a partir da oxidação do ácido palmítico 1,0mM por músculos *soleus* de ratos normais na ausência e na presença de inibidores da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos.

Adição	$^{14}\text{CO}_2$ liberado ( $\times 10^{-4} \mu\text{mol/mg.2h}$ )	% inibição
-----	4,6 $\pm$ 0,26	
Etomoxir 75 $\mu\text{M}$	2,31 $\pm$ 0,29	50 #
Etomoxir 150 $\mu\text{M}$	2,51 $\pm$ 0,21	45 #
Dicloroacetato 3mM	2,85 $\pm$ 0,25	38 #
Etomoxir 75 $\mu\text{M}$ + Dicloroacetato 3mM	2,31 $\pm$ 0,18	50 #

Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 5 a 12 músculos. #  $p < 0,005$  em relação à ausência dos inibidores de oxidação.

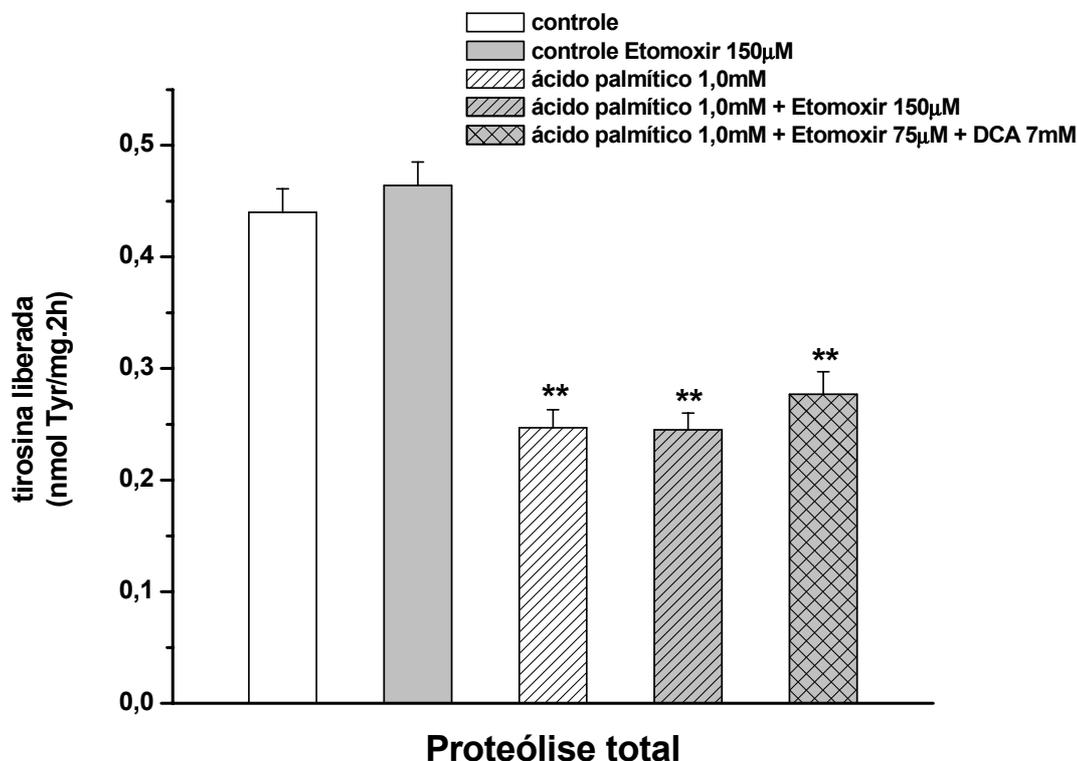


**Figura 4:** Efeito de diferentes concentrações e combinações de Etomoxir e Dicloroacetato (DCA) na oxidação do ácido palmítico (0,3 $\mu\text{Ci/ml}$ ; 1,0mM). Os resultados são expressos como médias percentuais  $\pm$  EPM dos valores de  $^{14}\text{CO}_2$  formado de músculos incubados na presença de ácido palmítico 1,0mM e de inibidores da sua oxidação em relação aos músculos controles (incubados somente com ácido palmítico e considerados como 100%). Os valores foram obtidos de 5 a 12 músculos por grupo e representam um experimento típico.

#  $p < 0,005$  vs ácido palmítico.

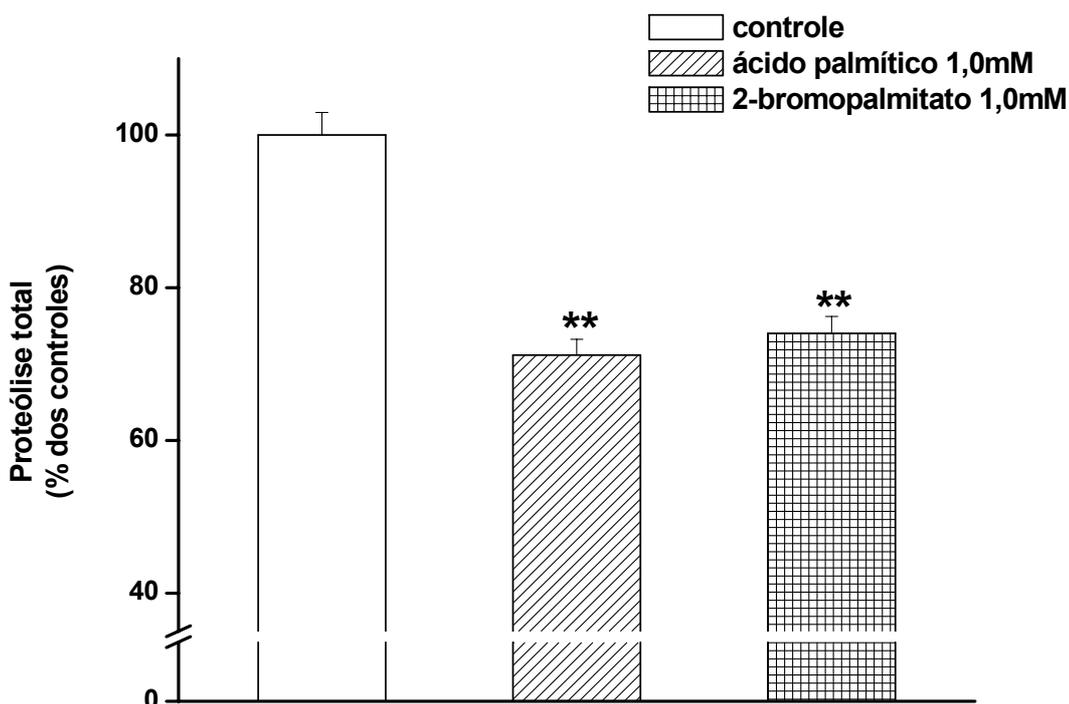
Na Figura 5 são mostrados os valores médios de proteólise total (expressos como valores absolutos de tirosina liberada no meio de incubação) de *soleus* de animais normais, incubados na presença somente de Etomoxir, somente de ácido palmítico 1,0mM ou na presença de ácido palmítico e inibidores (Etomoxir e/ou DCA). Observa-se que a presença apenas de Etomoxir não alterou a atividade proteolítica total desses músculos, indicando que essa droga não possui efeito *in vitro* per si neste processo metabólico. Além disso, a conseqüente inibição, em aproximadamente 50%, da oxidação do ácido palmítico não alterou sua capacidade em reduzir a proteólise total em *soleus*. Resultados qualitativamente semelhantes de

proteólise total foram encontrados utilizando-se diferentes concentrações e combinações de Etomoxir e DCA.



**Figura 5:** Efeito da inibição da oxidação do ácido palmítico por Etomoxir na **proteólise total** em músculos *soleus* de ratos normais. Os resultados são expressos como médias  $\pm$  EPM. Os valores foram obtidos de 7 a 8 músculos por grupo e representam um experimento típico, que foi repetido pelo menos 2 vezes, tendo sido obtidos resultados semelhantes. \*\*  $p < 0,0005$  vs controle.

Tal achado corrobora os valores apresentados na Figura 6, situação em que músculos *soleus* foram incubados com 2-bromopalmitato (1,0mM). Pode-se verificar que a atividade proteolítica total de *soleus* incubados com bromopalmitato foi 25% menor que na sua ausência, redução semelhante àquela observada quando músculos foram incubados na presença do ácido palmítico 1,0mM, sugerindo que este efeito inibidor da proteólise não depende da  $\beta$ -oxidação do ácido graxo.

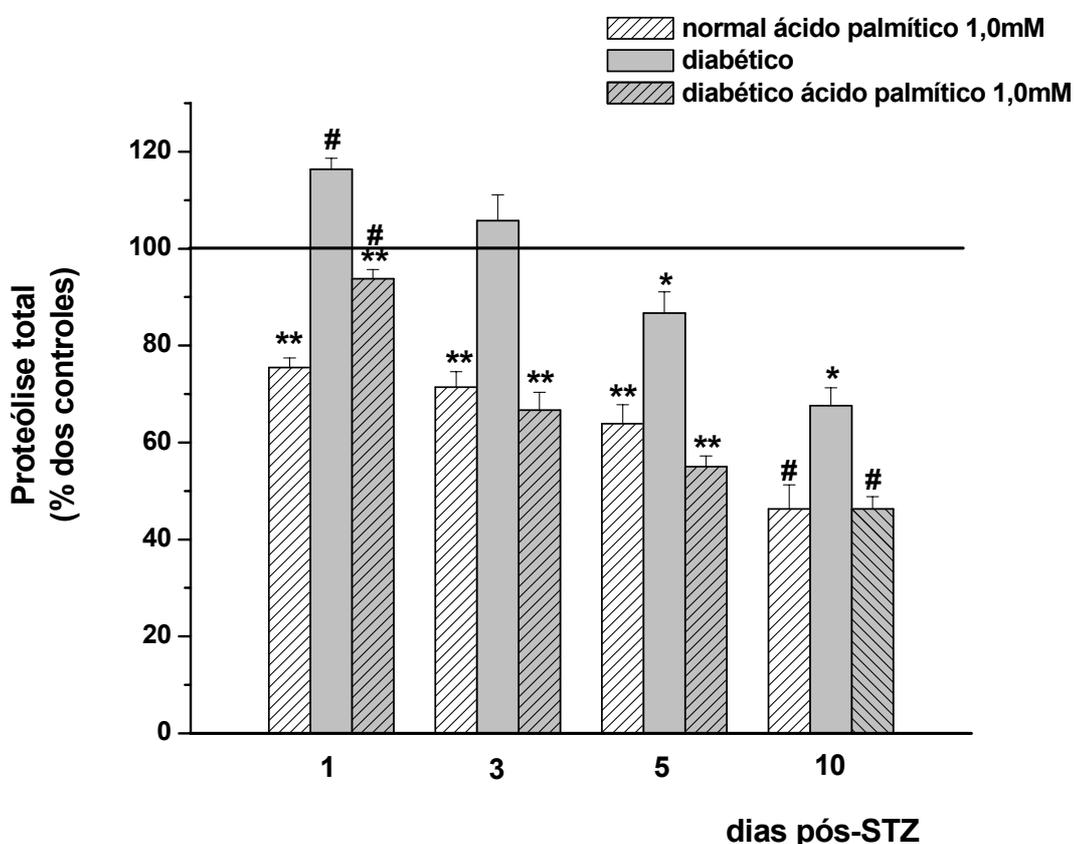


**Figura 6:** Efeito do ácido palmítico e do 2-bromopalmitato (1,0mM) na **proteólise total** em músculos **soleus** de ratos normais. Os resultados são expressos como médias percentuais  $\pm$  EPM dos grupos na presença de ácido palmítico ou de 2-bromopalmitato em relação ao grupo controle (considerado como 100%). Os valores foram obtidos de 8 a 12 músculos por grupo e representam um experimento típico. \*\*  $p < 0,0005$  vs controle.

### 3.3) Efeito do ácido palmítico na proteólise total em **soleus** de ratos diabéticos

Uma vez encontrado um efeito antiproteolítico do ácido palmítico em **soleus** e EDL de ratos normais, tornou-se interessante investigar se essa resposta era encontrada também em músculo esquelético de animais em diferentes períodos de diabetes (1, 3, 5 e 10 dias). A Figura 7 apresenta os valores de proteólise total (expressos como percentuais médios em relação aos animais normais cujos músculos foram incubados na ausência de ácido palmítico, considerados como 100%) de **soleus** de ratos após 1, 3, 5 e 10 dias de diabetes e cujos músculos foram incubados na ausência e na presença de ácido palmítico 1,0mM. Podemos verificar que o perfil de resposta da proteólise total de **soleus** de ratos diabéticos reproduziu resultados anteriormente obtidos no laboratório (Pepato *et al.*, 1996): houve um aumento de aproximadamente 16% na degradação de proteínas neste músculo

após 1 dia de diabetes; no entanto, esses valores aproximaram-se daqueles obtidos no grupo normal quando os animais encontravam-se no 3º dia de deficiência insulínica. Já os valores de proteólise total em *soleus* de ratos após 5 e 10 dias de diabetes apresentaram-se significativamente menores que os normais (redução de 13% e 32% respectivamente). A incubação dos músculos de ratos diabéticos com ácido palmítico 1,0mM ocasionou uma redução da proteólise total em todos os períodos estudados, sendo de 19% no 1º dia de diabetes, 37% no 3º e 5º dias e de 34% no 10º dia de deficiência insulínica, independente se o músculo apresentava atividade proteolítica maior ou menor que os controles.

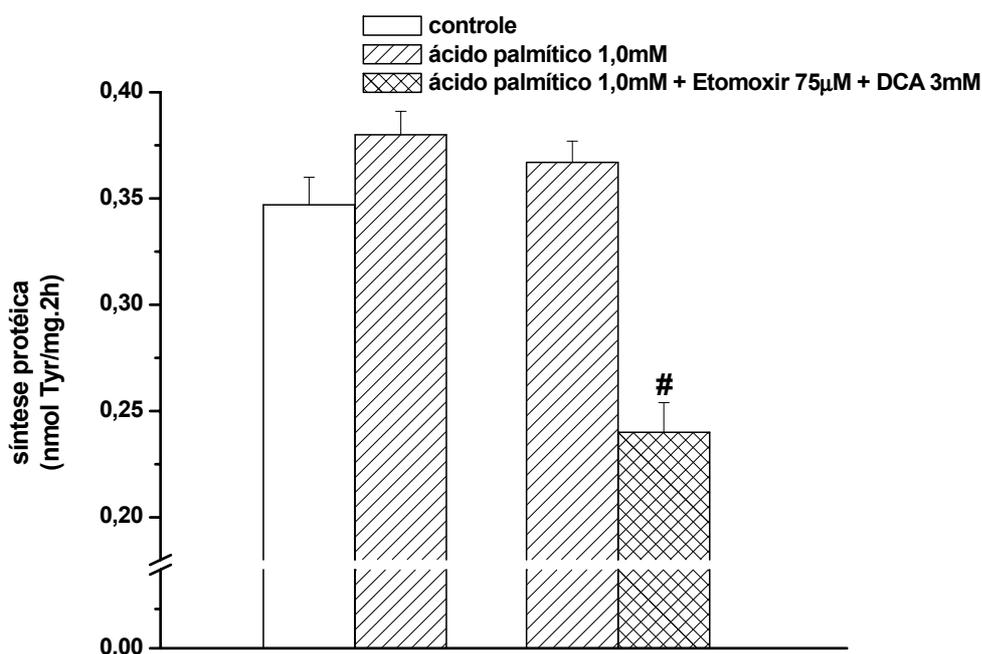


**Figura 7:** Efeito do ácido palmítico (1,0mM) na **proteólise total** em músculos **soleus** de ratos após 1, 3, 5 e 10 dias de diabetes. Os resultados são expressos como médias percentuais  $\pm$  EPM dos grupos na presença de ácido palmítico em relação ao grupo normal controle (considerado como 100%). Os valores foram obtidos de 6 a 8 músculos por grupo e representam experimentos típicos. \*  $p < 0,05$  (vs normal controle); #  $p < 0,005$  (vs normal controle ou normal ácido palmítico ou vs diabético) e \*\*  $p < 0,0005$  (vs normal controle ou vs diabético).

### 3.4) Velocidade da síntese de proteínas em *soleus* incubados na ausência e na presença de ácido palmítico e de inibidores de sua oxidação

Após a verificação do papel do ácido palmítico na proteólise total e na atividade das vias proteolíticas em músculo *soleus* e EDL de ratos normais, o presente trabalho passou a investigar se o ácido palmítico promovia alteração na síntese de proteínas em músculos desses animais. Para isso, músculos *soleus* foram incubados com ácido palmítico 1,0mM na ausência e na presença de inibidores de sua oxidação (Etomoxir e DCA).

Os valores da velocidade de síntese protéica em *soleus* de animais normais, incubados na ausência e na presença de ácido palmítico 1,0mM e de Etomoxir 75 $\mu$ M e DCA 3mM encontram-se na Figura 8. A adição de ácido palmítico ao meio de incubação não causou modificações na síntese de proteínas. No entanto, quando se adicionou Etomoxir e DCA, houve redução na velocidade de síntese protéica de aproximadamente 35%, provavelmente devido ao menor fornecimento de ATP para o processo, ocasionado pela inibição da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos.



**Figura 8:** Efeito do ácido palmítico 1,0mM e da inibição de sua oxidação na **síntese protéica** em músculos ***soleus*** de ratos normais. Os resultados são expressos como médias  $\pm$  EPM dos grupos experimentais. Os valores foram obtidos de 6 a 8 músculos por grupo e representam um experimento típico, que foi repetido pelo menos 2 vezes, tendo sido obtido resultados semelhantes.

#  $p < 0,005$  vs controle.

### 3.5) Efeito do $\beta$ -OH butirato na proteólise total e na atividade das vias proteolíticas em músculo esquelético de ratos jovens

Vários estudos sugerem que a redução da proteólise muscular observada no diabetes crônico ou no jejum prolongado seja decorrente, entre outros fatores, das altas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres de cadeia longa, assim como também de ácidos graxos de cadeia curta, os corpos cetônicos. Assim, o presente trabalho investigou o papel dos corpos cetônicos no metabolismo protéico muscular em ratos normais jovens. Esses estudos avaliaram o efeito de diferentes concentrações de  $\beta$ -OH butirato na proteólise total de músculos *soleus* e EDL de ratos normais. Além disso, foram estudadas as alterações ocorridas nas atividades das vias proteolíticas lisossomal, dependente de cálcio e dependente de ATP-Ub-proteassoma em músculo *soleus* nas mesmas condições.

#### 3.5.1) Proteólise total em *soleus* e EDL de ratos normais

A Tabela 7 apresenta os valores médios de tirosina liberada de músculos *soleus* e EDL incubados na presença de diferentes concentrações de  $\beta$ -OH butirato. Foi observada uma redução significativa apenas em *soleus* incubados com  $\beta$ -OH butirato 2,0mM (redução de aproximadamente 18%), sendo que menores e maiores concentrações não apresentaram efeito antiproteolítico.

Pelo fato de não ter sido observado efeito na proteólise total em *soleus* com concentrações de  $\beta$ -OH butirato diferentes de 2,0mM, foi estudado o efeito do  $\beta$ -OH butirato na proteólise total em músculos EDL de ratos normais utilizando apenas essa concentração. No entanto, não houve uma alteração significativa na proteólise total em músculos EDL incubados na presença de  $\beta$ -OH butirato 2,0mM.

**Tabela 7:** Avaliação da **proteólise total** pela medida da tirosina liberada no meio (nmol/mg.2h) pelos músculos *soleus* e EDL de ratos normais, incubados na ausência e na presença de diferentes concentrações de  $\beta$ -OH butirato.

Proteólise total (nmol/mg.2h)			
$\beta$ -OH butirato (mM)	(-)	(+)	Diferença (%)
<u><i>soleus</i></u>			
2,0	0,426 $\pm$ 0,013	0,350 $\pm$ 0,011	- 18 #
4,0	0,448 $\pm$ 0,02	0,406 $\pm$ 0,011	ns
6,0	0,430 $\pm$ 0,02	0,446 $\pm$ 0,025	ns
10,0	0,434 $\pm$ 0,013	0,426 $\pm$ 0,012	ns
<u>EDL</u>			
2,0	0,296 $\pm$ 0,016	0,264 $\pm$ 0,009	ns

Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 8 músculos. ns: não significativo; #  $p < 0,005$  na comparação entre os grupos.

### 3.5.2) Participação das vias proteolíticas em *soleus* de ratos normais

Com a demonstração das alterações ocorridas na proteólise total em músculos *soleus* incubados na presença de  $\beta$ -OH butirato, o presente trabalho passou a investigar qual(is) via(s) proteolítica(s) estaria(m) contribuindo para estas respostas. Assim, foram estudadas as participações das vias proteolíticas lisossomal, dependente de cálcio e dependente de ATP-Ub-proteassoma em *soleus* incubados na presença de  $\beta$ -OH butirato 2,0mM.

Nas Tabelas 8 e 9 estão sumarizados os valores médios da contribuição das vias dependente de cálcio e dependente de ATP-Ub-proteassoma respectivamente nos músculos *soleus* incubados na ausência e na presença de  $\beta$ -OH butirato 2,0mM. Não foi observada alteração na via dependente de cálcio em relação aos músculos controles, enquanto houve uma redução de 27% na atividade da via proteolítica dependente de ATP-Ub-proteassoma nos músculos incubados na presença de  $\beta$ -OH butirato. A Figura 9 apresenta os valores percentuais da participação das vias lisossomal, dependente de cálcio e dependente de ATP-Ub-proteassoma em músculos *soleus* incubados na ausência e na presença de  $\beta$ -OH butirato (2,0mM).

Pode-se ainda observar que não houve alteração na atividade da via lisossomal em músculos incubados na presença de  $\beta$ -OH butirato.

**Tabela 8:** Tirosina liberada no meio (nmol/mg.2h) pelos músculos *soleus* de ratos normais, incubados na ausência e na presença de  $\beta$ -OH butirato 2,0mM.

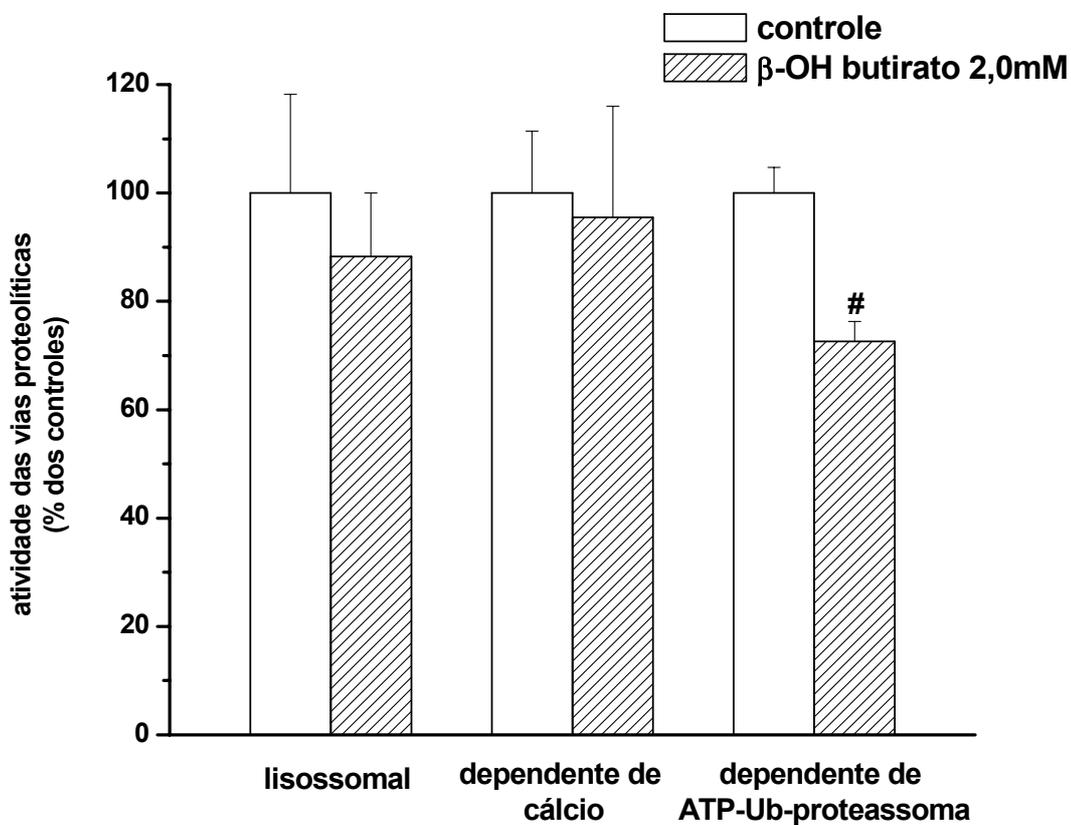
Tirosina liberada (nmol/mg.2h)			
Manutenção do comprimento de repouso	$\beta$ -OH butirato (2,0mM)		Diferença (%)
	(-)	(+)	
(-)	0,365 $\pm$ 0,017	0,311 $\pm$ 0,014	- 15 #
(+)	0,321 $\pm$ 0,015	0,269 $\pm$ 0,012	- 16 *
componente dep. cálcio	0,044 $\pm$ 0,005 #	0,042 $\pm$ 0,009 #	ns

Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 7 a 8 músculos. ns: não significativo; \*p< 0,05 e # p< 0,005 em relação à ausência do  $\beta$ -OH butirato; # p< 0,005 em relação à ausência dos inibidores da via.

**Tabela 9:** Tirosina liberada no meio (nmol/mg.2h) pelos músculos *soleus* de ratos normais, incubados na ausência e na presença de  $\beta$ -OH butirato 2,0mM.

Tirosina liberada (nmol/mg.2h)			
Adição	$\beta$ -OH butirato (2,0mM)		Diferença (%)
	(-)	(+)	
MG132			
(-)	0,302 $\pm$ 0,015	0,264 $\pm$ 0,008	- 13 *
(+)	0,112 $\pm$ 0,011	0,126 $\pm$ 0,0004	ns
componente dep. ATP-Ub-proteassoma	0,190 $\pm$ 0,009 #	0,138 $\pm$ 0,007 #	- 27 #

Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 7 a 8 músculos. ns: não significativo; \*p< 0,05 em relação à ausência do  $\beta$ -OH butirato e # p< 0,005 em relação à ausência do  $\beta$ -OH butirato e em relação à ausência dos inibidores da via.

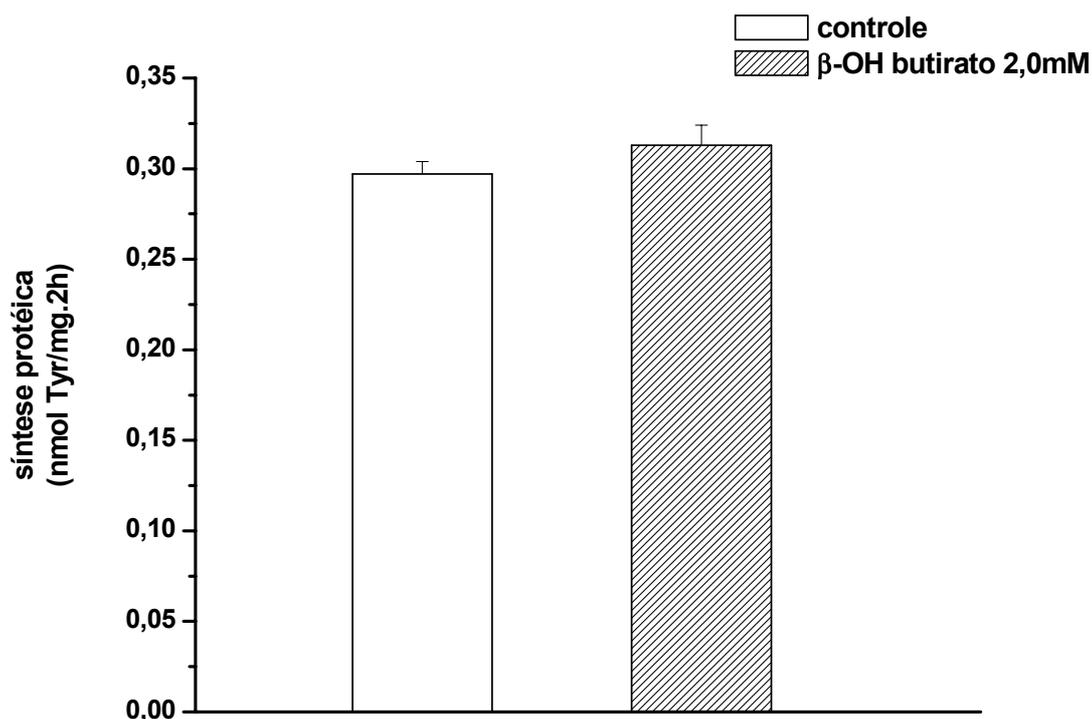


**Figura 9:** Efeito do  $\beta$ -OH butirato (2,0mM) na atividade das vias proteolíticas (lisossomal, dependente de cálcio e dependente de ATP-Ub-proteassoma) em músculos *soleus* de ratos normais. Os resultados são expressos como médias percentuais  $\pm$  EPM da participação das vias na presença de  $\beta$ -OH butirato em relação ao grupo controle (considerado como 100%). Os valores foram obtidos de 6 a 8 músculos por grupo e representam um experimento típico, que foi repetido pelo menos 2 vezes, tendo sido obtido resultados semelhantes. #  $p \leq 0,005$  ( $\beta$ -OH butirato vs controle).

### 3.6) Velocidade da síntese de proteínas em *soleus* incubados na ausência e na presença de $\beta$ -OH butirato

Após a verificação do papel do  $\beta$ -OH butirato na proteólise total e na atividade das vias proteolíticas em músculo *soleus* de ratos normais, o presente trabalho passou a investigar as alterações ocorridas na velocidade de síntese protéica em *soleus* de animais normais e que foram incubados com  $\beta$ -OH butirato 2,0mM.

Os valores da velocidade de síntese protéica em *soleus* de animais normais, incubados na ausência e na presença de  $\beta$ -OH butirato 2,0mM encontram-se na Figura 10. A adição de  $\beta$ -OH butirato ao meio de incubação não provocou alteração na velocidade de incorporação da tirosina em proteínas totais.



**Figura 10:** Efeito do  $\beta$ -OH butirato 2,0mM na **síntese protéica** em músculos *soleus* de ratos normais. Os resultados são expressos como médias  $\pm$  EPM dos grupos experimentais. Os valores foram obtidos de 10 músculos por grupo e representam um experimento típico.

## B) Experimentos *in vivo*

### 3.7) Efeito da inibição da lipólise pela administração *in vivo* de ácido nicotínico na proteólise total em diafragma de ratos normais e diabéticos

Uma vez que se observou o efeito *in vitro* antiproteolítico do ácido palmítico em *soleus* e EDL de ratos jovens, tornou-se interessante investigar *in vivo* se alterações na concentração de ácidos graxos livres no plasma de ratos diabéticos, através da administração de um inibidor da lipólise, como o ácido nicotínico, ocasionaria alteração na atividade proteolítica desse tecido. A idéia inicial foi investigar se músculos de ratos diabéticos após 7 dias de administração de STZ, os quais apresentam proteólise inibida (Pepato *et al.*, 1996) apresentariam alteração nesse processo metabólico se houvesse uma inibição da oferta de AGL para o músculo (pela administração de inibidores da lipólise). O problema encontrado foi que esses ratos jovens diabéticos (5 a 10 dias após a administração de STZ) já apresentavam valores plasmáticos de AGL reduzidos (semelhantes aos controles) provavelmente decorrente das pequenas reservas de tecido adiposo desses animais. Provavelmente a reduzida proteólise observada nesses ratos nesses períodos de diabetes não pode ser explicada pelos níveis plasmáticos de AGL.

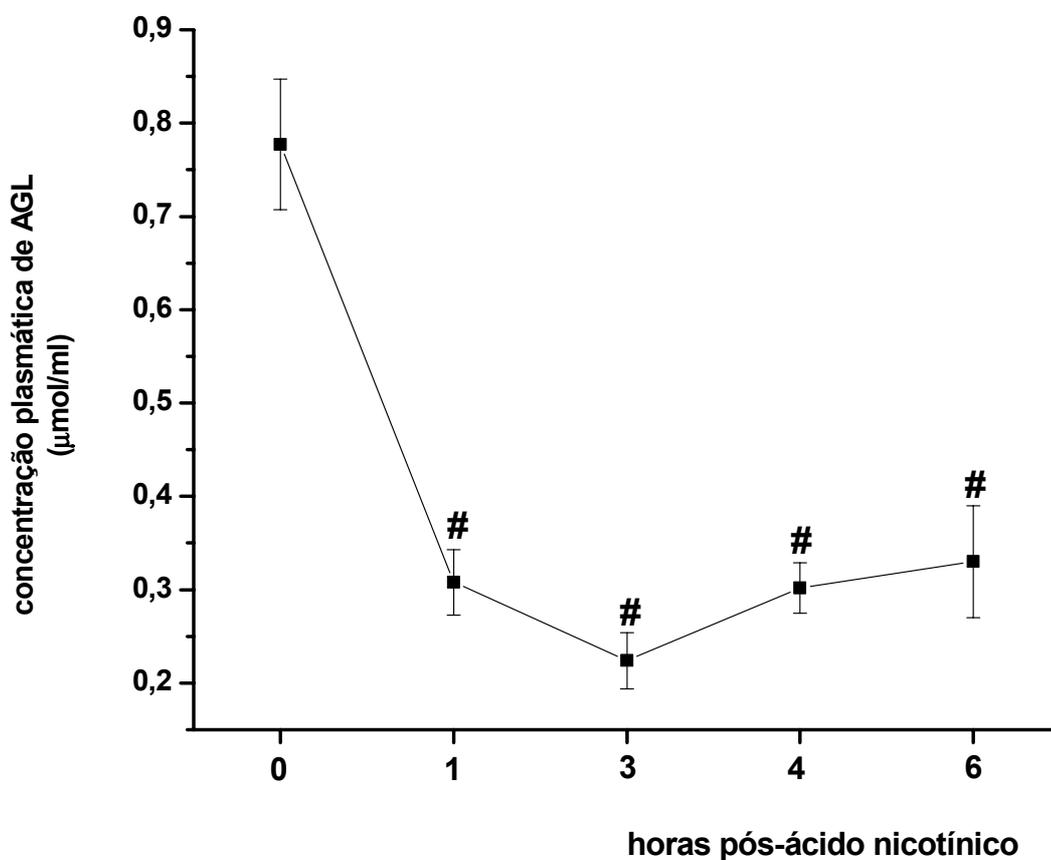
#### 3.7.1) Efeito do ácido nicotínico nas concentrações plasmáticas de AGL

Tendo sido verificado que os níveis plasmáticos de AGL em ratos jovens (70-80g), após 7 dias de diabetes, já estavam próximos aos valores encontrados em animais normais, tornou-se mais adequado trabalhar com animais adultos diabéticos, cujos depósitos de gordura são maiores, e conseqüentemente os níveis plasmáticos de AGL permanecem altos por maior período de tempo.

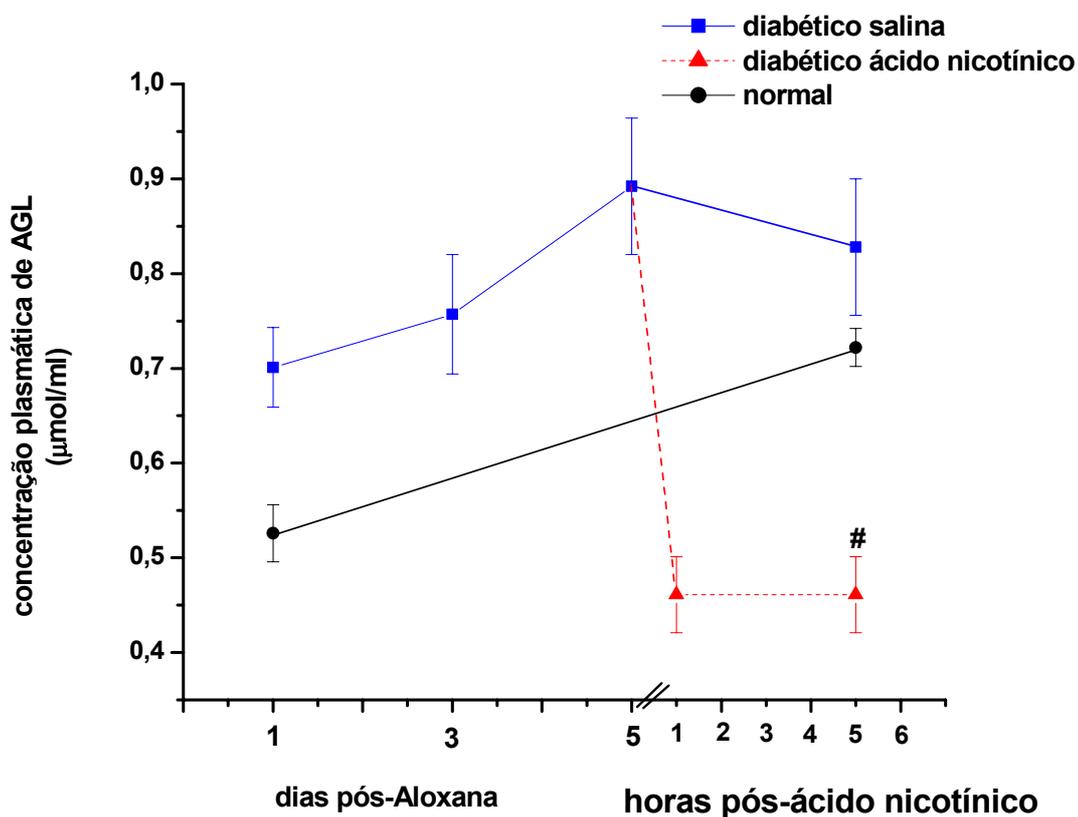
Primeiramente foi observado o efeito do ácido nicotínico na redução da lipólise no tecido adiposo. A Figura 11 mostra o efeito de uma injeção de ácido nicotínico (150mg/kg peso corporal; ip) nos níveis plasmáticos de AGL ( $\mu\text{mol/ml}$  plasma) em ratos jovens após 3 dias de administração de STZ. Verifica-se uma redução significativa nos níveis plasmáticos de AGL logo após 1 h, efeito que permaneceu constante até 6 h após a administração de ácido nicotínico.

Na Figura 12, estão apresentados os valores médios dos níveis plasmáticos de AGL ( $\mu\text{mol/ml}$  plasma) de ratos adultos normais (controles) e diabéticos 1, 3 e 5

dias após a administração de aloxana. No 5º dia de deficiência insulínica, os ratos foram tratados com ácido nicotínico e após 5 horas, o sangue foi coletado para medida dos AGL plasmáticos e os músculos foram retirados para medida da proteólise. Houve uma redução significativa nos níveis plasmáticos de AGL dos animais tratados com ácido nicotínico por um período de aproximadamente 5 horas.



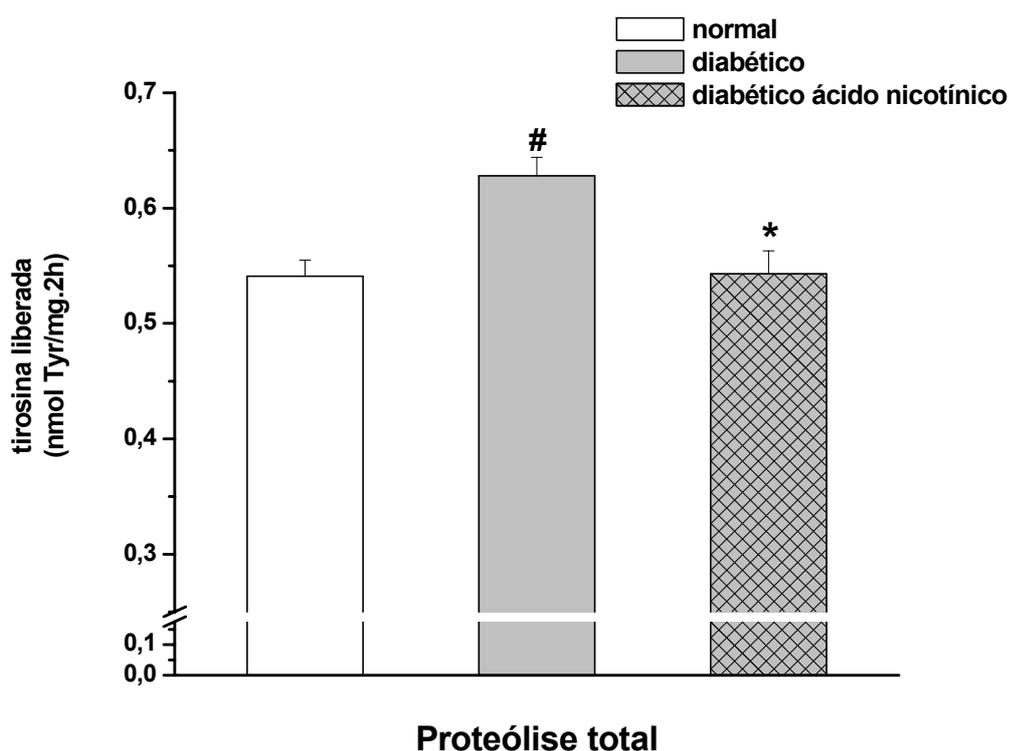
**Figura 11:** Concentração plasmática de AGL ( $\mu\text{mol/ml}$  plasma) de ratos jovens diabéticos (após 3 dias de administração de STZ) e após 1, 3, 4 e 6 horas de uma injeção intraperitoneal de ácido nicotínico ( $150\text{mg/kg}$  peso). Os resultados são expressos como médias  $\pm$  EPM de 5 a 7 animais por grupo. #  $p < 0,005$  vs tempo 0.



**Figura 12:** Concentração plasmática de AGL ( $\mu\text{mol/ml}$  plasma) de ratos adultos (200-220g) normais, diabéticos (após 1, 3 e 5 dias de administração de Aloxana) e diabéticos após 5 horas ao início do tratamento com ácido nicotínico (150mg/kg peso, ip, 2 em 2h). Os resultados são expressos como médias  $\pm$  EPM de 8 animais por grupo. #  $p < 0,005$  vs controle ou diabético salina.

### 3.7.2) Atividade proteolítica total

Na Figura 13, estão apresentados os valores de proteólise total (expressos como valores absolutos de tirosina liberada no meio de incubação) de músculos diafragma de animais normais e diabéticos (5 dias) tratados com salina ou com ácido nicotínico durante 5 horas (150mg/kg peso corporal; ip; 2 em 2 horas). Pode-se observar um aumento de aproximadamente 14% na degradação de proteínas neste músculo após 5 dias de diabetes e uma redução de aproximadamente 12% na atividade proteolítica em ratos diabéticos tratados com ácido nicotínico em relação aos diabéticos salina. Experimentos realizados *in vitro*, incubando-se músculos diafragma de ratos adultos normais e diabéticos (5 dias) na presença de ácido nicotínico (16 $\mu$ M) mostraram que esta droga *per si* apresentou um efeito antiproteolítico nos músculos de ratos diabéticos, sendo observada uma redução significativa de 21% na atividade proteolítica total ( $0,561 \pm 0,032$  nmol Tyr/mg.2h vs  $0,441 \pm 0,016$  nmol Tyr/mg.2h).



**Figura 13:** Efeito do tratamento de 5 horas com ácido nicotínico (150mg/kg peso, i.p., 2 em 2h) na **proteólise total** em músculos **diafragma** de ratos após 5 dias de diabetes. Os resultados são expressos como médias  $\pm$  EPM dos grupos experimentais. Os valores foram obtidos de 8 músculos por grupo e representam um experimento típico. \* $p < 0,05$  vs diabético e #  $p < 0,005$  vs normal.

***DISCUSSÃO***

---

#### 4) Discussão

Diversos estudos demonstram que os ácidos graxos livres (AGL) podem exercer efeitos tanto agudos quanto crônicos no metabolismo. É importante ressaltar que o presente trabalho teve como propósito investigar os efeitos agudos dos AGL (ácido palmítico) e dos corpos cetônicos ( $\beta$ -OH butirato) no metabolismo de proteínas em músculo esquelético em condições normais e de diminuição da utilização de glicose. Dessa forma, nosso interesse seria o estudo dos efeitos benéficos que os AGL ou corpos cetônicos podem apresentar, diferente dos possíveis efeitos deletérios causados pelos lipídios e seus metabólitos, em condições que ocasionam uma elevação prolongada dos níveis plasmáticos de AGL e, por conseguinte, geram resistência à insulina como, por exemplo, diabetes tipo 2 não dependente de insulina, obesidade ou a chamada síndrome metabólica.

Trabalhos publicados haviam sugerido um papel poupador de proteínas dos ácidos graxos. Assim, por exemplo, Ferrannini *et al.* (1986) demonstraram que a elevação dos níveis circulantes de AGL por infusão de lipídios e heparina em humanos promoveu um efeito hipoaminoacidêmico, comprovado pela queda nos níveis plasmáticos de aminoácidos glicogênicos (alanina, glicina, fenilalanina, serina, treonina e cisteína) e aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) e que essa resposta poderia ter sido facilitada pela insulina, já que houve estímulo de sua liberação pela infusão de AGL. Também, Tessari *et al.* (1986) infundiram cães jejuados com emulsão de triglicérides e heparina e observaram que, paralelamente a um aumento dos níveis plasmáticos de AGL, houve redução da oxidação de leucina, ressaltando a importância potencial da disponibilidade dos ácidos graxos em poupar as proteínas corporais. Por outro lado, Walker *et al.* (1993) não detectaram qualquer efeito do aumento das concentrações plasmáticas de AGL (por infusão de triglicérides) no fluxo de fenilalanina corporal total ou do antebraço, enquanto as velocidades de síntese e degradação protéica no antebraço diminuíram.

No entanto, estudos do papel direto dos ácidos graxos na síntese e na degradação de proteínas musculares não haviam ainda sido realizados. Dessa forma, o presente trabalho demonstrou que o ácido palmítico promoveu uma redução da proteólise total *in vitro* após 2h de incubação em músculos *soleus* de

ratos normais, com todas as concentrações de ácido palmítico utilizadas (0,3-2,0mM), bem como em músculos EDL na presença de ácido palmítico nas concentrações de 0,3 e 1,0mM. Entretanto, estudos recentes de Zhou *et al.* (2007) mostraram que camundongos submetidos durante 5 meses a uma dieta hiperlipídica e que desenvolveram resistência à insulina (aumento dos níveis plasmáticos de AGL, redução dos níveis de adiponectina, hiperglicemia e hiperinsulinemia) apresentaram aumento da proteólise. Os mesmos autores utilizaram culturas de células musculares incubadas por 48h na presença de ácidos graxos saturados e insaturados e verificaram ocorrer aumento da proteólise e ativação da E3 ligase por supressão da via de sinalização IRS-1/Akt. Acredita-se então que, nessas condições de exposição prolongada a altos níveis de AGL e resistência à insulina, possa ocorrer aumento da proteólise muscular.

Também foi mostrado no presente trabalho o efeito antiproteolítico do ácido palmítico em músculos de ratos submetidos a diferentes períodos de diabetes induzido por STZ, mostrando que o efeito agudo desse ácido graxo no metabolismo de proteínas é semelhante em ratos normais e diabéticos, ou seja, que possíveis diferenças moleculares nos processos metabólicos e nas vias de sinalização hormonal ocasionadas pela insuficiência insulínica não alteram o efeito antiproteolítico promovido pelo ácido palmítico.

A partir do estudo da atividade proteolítica total nos dois tipos de músculos e a verificação de que as respostas eram mais evidentes em músculos *soleus* na presença de ácido palmítico 1,0mM, foi então iniciada a investigação do papel do ácido palmítico na atividade das diferentes vias proteolíticas em músculo *soleus* de ratos normais. Os resultados obtidos não mostraram alteração nas vias proteolíticas lisossomal, dependente de ATP-Ub-proteassoma e residual na presença de ácido palmítico. No entanto, houve uma redução significativa de aproximadamente 50% na via dependente de cálcio nesses músculos incubados na presença desse ácido graxo.

Redução na atividade da via dependente de cálcio também foi encontrada em várias outras situações fisiológicas e patológicas estudadas em nosso laboratório. Por exemplo, Navegantes *et al.* (1999, 2001, 2006) demonstraram que as catecolaminas inibem a degradação protéica muscular pela redução na atividade da via proteolítica dependente de cálcio. Os mesmos autores (2001) demonstraram diminuição da via proteolítica dependente de cálcio em músculo de animais normais

incubados na presença de dibutilil AMPc (análogo de AMPc) ou isobutilmetilxantina (inibidor não-específico da fosfodiesterase do AMPc). Baviera *et al.* (2007) demonstraram que o tratamento *in vivo* de ratos e a incubação de músculo esquelético *in vitro* com pentoxifilina (PTX), droga com comprovada ação anti-proteolítica, promoveram inibição da atividade da via dependente de cálcio em EDL de ratos diabéticos, com redução dos níveis protéicos da calpaína. Outros estudos (Costelli *et al.*, 2002) também demonstraram queda na atividade proteolítica das calpaínas em músculo gastrocnêmio de ratos portadores de sarcoma de Yoshida AH-130 (situação de comprovada atrofia muscular) após tratamento com PTX. Nesses casos, foi sugerido que a redução da atividade da via dependente de cálcio estava associada com aumento dos níveis intracelulares de AMPc. Se os ácidos graxos interferem em componentes das vias de sinalização que aumentam o conteúdo de AMPc é uma questão que permanece ainda para ser esclarecida.

Embora no modelo *in vitro* do nosso trabalho não tenha sido encontrado alteração da atividade da via proteolítica dependente de ATP-Ub-proteassoma, Whitehouse *et al.* (2001) estudaram músculo *soleus* de camundongos portadores do tumor MAC16 (indutor de caquexia) e mostraram que o tratamento desses animais com ácido eicosapentanóico (EPA - ácido graxo de 20 átomos de carbono) (0,5-2,5g/kg/dia durante 2 dias) atenuou a perda de peso e suprimiu significativamente a degradação protéica em *soleus* por inibição da via dependente de ATP-Ub-proteassoma, com redução da expressão de subunidades  $\alpha$  do proteassoma 20S. Ando *et al.* (2004) mostraram regulação, por ácidos graxos, da degradação da tirosinase, uma enzima crítica associada com a biossíntese de melanina nos melanócitos e melanomas. Foi observado que o ácido linoléico (C18:2) acelerou a degradação da tirosinase, por aumento de sua ubiquitinação, enquanto o ácido palmítico inibiu a proteólise, por redução da quantidade de tirosinase ubiquitinada. Esses resultados nos fornecem embasamento para estudar o efeito de outros tipos de ácidos graxos, como insaturados e poliinsaturados na atividade das diferentes vias proteolíticas em músculo esquelético.

No decorrer do desenvolvimento do presente trabalho, surgiu uma importante questão: seria o efeito do ácido palmítico na redução da proteólise dependente de sua oxidação?

A utilização de inibidores da oxidação dos ácidos graxos, como o Etomoxir (que inibe a CAT I) e o DCA (que eleva a concentração intracelular de malonil-CoA)

mostrou que o efeito do ácido palmítico na redução da proteólise permaneceu semelhante ao observado em músculos incubados na ausência dos inibidores de sua oxidação. Além disso, o uso do bromopalmitato, um análogo do ácido palmítico, porém não metabolizado, também promoveu uma diminuição na degradação de proteínas na mesma magnitude observada na presença de ácido palmítico. Esses achados sugerem que o efeito do ácido palmítico na proteólise em músculo esquelético parece não depender de sua  $\beta$ -oxidação mitocondrial, embora valha a pena salientar que a inibição da oxidação obtida com inibidores foi de 50% (resultado obtido pela medida de  $^{14}\text{CO}_2$  proveniente da oxidação do [1- $^{14}\text{C}$ ]palmitato). Embora estudos adicionais sejam necessários para o entendimento dos mecanismos responsáveis por este efeito antiproteolítico do ácido palmítico, algumas possibilidades podem ser apresentadas. Poderiam os AGL, por sua natureza lipofílica, interferirem diretamente na estrutura molecular das calpaínas, enzimas localizadas normalmente no disco Z do aparelho contrátil muscular e com isso reduzirem sua atividade proteolítica? Ou mesmo diminuir a própria ligação do cálcio à subunidade de 80kDa das calpaínas e, com isso, inibir sua atividade? Dessa forma, o ácido palmítico poderia exercer seu efeito antiproteolítico pelo contato direto com os componentes da via proteolítica dependente de cálcio, inibindo, assim, sua atividade, ou interferindo na atividade de quinases envolvidas na modulação das calpaínas. Outra possibilidade seria que vias de sinalização celular responsáveis pelo controle da proteólise fossem alteradas pelo aumento dos ácidos graxos no interior da célula, já que as moléculas de ácidos graxos podem penetrar na membrana plasmática e influenciar o estado físico-químico dos domínios lipídicos (Renaud *et al.*, 1985). Após sua incorporação na membrana, os ácidos graxos perturbam a estrutura da bicamada, levando a alterações nas interações membrana plasmática-citoesqueleto e modificando, dessa forma, o funcionamento das proteínas integrais (Klausner *et al.*, 1980). Considerando que essas proteínas tratam-se de receptores, canais ou sistemas enzimáticos implicados na transdução de sinais, não é difícil imaginar a possibilidade de alteração celular induzida por um aumento da disponibilidade de ácidos graxos para o tecido.

Uma outra hipótese seria que os ácidos graxos poderiam funcionar como moléculas sinalizadoras. Relatos na literatura mostram que agudamente os ácidos graxos de cadeia longa (ácido palmítico) aumentam a fosforilação e a atividade da AMPK (proteína quinase dependente de AMP), que, por sua vez, fosforila e inativa a

acetil-CoA carboxilase, reduzindo o conteúdo de malonil-CoA e a inibição da carnitina aciltransferase I, favorecendo a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos (Fediuc *et al.*, 2006). Efeitos dos ácidos graxos na via de sinalização de insulina também foram demonstrados. A exposição aguda (por 1h) de músculos *soleus* de ratos a ácido palmítico diminuiu a fosforilação em tirosina de IRS-1 e -2 e da Akt, apesar de que essas alterações não foram suficientes para promover resistência à insulina e impedir o efeito estimulador da síntese de glicogênio (em resposta à insulina) (Hirabara *et al.*, 2003), enquanto que a exposição prolongada poderia levar a uma maior inibição da via de sinalização desse hormônio e, por conseguinte, à resistência à insulina (Hirabara *et al.*, 2003).

Além disso, sugere-se que os ácidos graxos possam exercer seu efeito antiproteolítico ao modular a atividade de fatores de transcrição e alterar a síntese de proteínas reguladoras do metabolismo. Um exemplo seriam os receptores ativados por proliferador peroxissomal (PPARs), membros de uma superfamília de receptores nucleares hormonais que estimulam a transcrição de genes específicos ao se ligarem a determinadas seqüências do DNA após a ativação pelo ligante apropriado (Tenenbaum *et al.*, 2005). Os PPARs possuem como ligantes naturais ácidos graxos de cadeia longa saturados e insaturados (Tanaka *et al.*, 2003) e estão envolvidos em diversas funções fisiológicas, como processos de diferenciação celular e no metabolismo, incluindo a homeostase lipídica (Holst *et al.*, 2003). Todas essas possibilidades merecem ser investigadas.

Apesar de promover uma resposta anti-proteolítica em músculos *soleus* e EDL, a incubação *in vitro* (por 2h) na presença de ácido palmítico não alterou a velocidade de síntese de proteínas totais (avaliada em músculo *soleus*). Lang *et al.* (2006) mostraram que a infusão de lipídios durante 5h em ratos reduziu a síntese protéica muscular por inativação dos fatores eucarióticos de iniciação da tradução. Por outro lado, os mesmos autores observaram que a elevação plasmática de AGL não alterou o efeito anabólico produzido pela leucina.

No entanto, quando foram utilizados inibidores da oxidação mitocondrial de ácidos graxos, foi observada uma redução significativa na velocidade de síntese protéica. Esses resultados nos levam a sugerir que as alterações na velocidade de síntese protéica observadas possam ter sido decorrentes da diminuição do fornecimento de ATP pela redução da  $\beta$ -oxidação das moléculas de ácidos graxos, alterando o estado energético da célula. Há alguns relatos na literatura que mostram

o efeito dos ácidos graxos, embora indiretamente, na velocidade de síntese de proteínas no tecido muscular. Assim, por exemplo, Crozier *et al.* (2003) sugerem que a presença dos AGL no músculo cardíaco é essencial para minimizar a inibição da tradução dos mRNA observada durante situações de deficiência insulínica, já que o tratamento de ratos diabéticos com niacina (100mg/kg durante 3 horas), que reduziu os níveis plasmáticos de AGL, promoveu diminuição da velocidade de síntese protéica em músculo esquelético (gastrocnêmio) e cardíaco.

Além disso, estudo de Rannels *et al.* (1970) mostrou que, em preparações de músculo cardíaco perfundido privadas de insulina, no qual ocorria uma alteração no processo de iniciação da tradução similar ao que ocorre em músculos esqueléticos ricos em fibras glicolíticas de animais jejuados ou diabéticos, essa falha podia ser revertida pela adição de insulina ou palmitato ao perfusado. Esses achados sugerem que os AGL plasmáticos estão envolvidos na manutenção da iniciação da tradução em músculo cardíaco. A observação de que a administração de um inibidor da oxidação de AGL resulta em inibição do processo de iniciação em coração de ratos (Crozier *et al.*, 2002) apóia essa hipótese. Nesse estudo, a supressão da  $\beta$ -oxidação por metilpalmoixirato causou alterações significativas na função de proteínas envolvidas com a iniciação da tradução do mRNA, como fatores eucarióticos de iniciação (eIFs), no músculo cardíaco, mas não no gastrocnêmio. Além disso, a razão ATP/AMP foi significativamente reduzida no coração, mas não em gastrocnêmio, após a inibição da  $\beta$ -oxidação, sugerindo que o estado energético da célula pode influenciar a velocidade da iniciação da tradução no músculo cardíaco.

Considerando essa última hipótese, uma questão interessante seria se esse efeito de redução da síntese protéica estaria relacionado à diminuição dos níveis celulares de ATP e poderia, assim, ser mediado por alteração na atividade da AMPK, uma enzima importante para manutenção do balanço energético a nível celular e corporal (Hardie *et al.*, 2006) e que está ativa em condições que envolvem depleção de ATP e acúmulo de ADP. Foi recentemente observado que a AMPK pode inibir uma quinase conhecida como mTOR (alvo de rapamicina em mamíferos), que é um intermediário da via de sinalização da insulina, e juntamente com fatores de crescimento e aminoácidos estimulam a síntese protéica e, dessa forma, o crescimento e a hipertrofia celular no músculo esquelético (Hardie & Sakamoto, 2006).

Em relação ao papel dos corpos cetônicos no metabolismo de proteínas, foi observado também um efeito antiproteolítico *in vitro* do  $\beta$ -OH butirato nos músculos *soleus*. A concentração que promoveu essa resposta foi de 2,0mM, com redução significativa na proteólise total de 18%. Alguns estudos sugerem que a hipercetonemia pode ser um fator que contribui para a redução do catabolismo protéico. Há relatos de redução da síntese protéica em músculos *extensor digitorum communis* (EDC) de aves alimentadas e redução da síntese e da degradação protéica em músculos EDC de aves jejuadas, incubados na presença de 4mM de acetoacetato ou  $\beta$ -OH butirato (Wu & Thompson, 1990). Palaiologos & Felig (1976) observaram que a incubação de diafragmas de ratos jejuados por 48h na presença de acetoacetato (1,0 e 3,0mM) e de  $\beta$ -OH butirato (2,0; 4,0 e 6,0mM) promoveu inibição da liberação de diversos aminoácidos no meio, sugerindo redução da proteólise pelos corpos cetônicos. A inibição do catabolismo de aminoácidos e do *turnover* de proteínas no músculo esquelético por corpos cetônicos pode ser um importante mecanismo de sobrevivência durante adaptação ao jejum.

Nair *et al.* (1988) estudaram o efeito de pequeno aumento das concentrações de corpos cetônicos em indivíduos normais no metabolismo de proteínas por infusão de  $\beta$ -OH butirato e observaram redução substancial na oxidação de leucina. As concentrações plasmáticas de leucina não se alteraram e houve um pequeno (10%), mas significativo, aumento da incorporação de leucina em proteína no músculo esquelético. Estudo de Pawan & Semple (1983) mostrou que a administração oral e endovenosa de  $\beta$ -OH butirato em indivíduos obesos jejuados ou submetidos a uma dieta com baixo teor energético promoveu uma redução significativa na perda de proteínas corporais totais (estimada pela excreção urinária de nitrogênio e de 3-metilhistidina). Buse *et al.* (1972) demonstraram que aumentos fisiológicos de  $\beta$ -OH butirato inibiram a liberação de  $^{14}\text{CO}_2$  proveniente da oxidação de BCAA em diafragma isolado. Por outro lado, Miles *et al.* (1983) demonstraram que a infusão de  $\beta$ -OH butirato por 3h em indivíduos no estado pós-prandial não alterou o fluxo de carbono proveniente de leucina, indicando que a hipercetonemia não alterou a proteólise nesses indivíduos. Além disso, estudos *in vitro* (Buse *et al.*, 1967) não demonstraram aumento na incorporação de leucina marcada em proteína do músculo diafragma na presença de  $\beta$ -OH butirato. De forma semelhante, os resultados do presente trabalho não mostraram alteração na velocidade de síntese

protéica em músculos *soleus* incubados *in vitro* por 2h na presença de  $\beta$ -OH butirato 2,0mM.

A partir dos achados de redução na atividade proteolítica total em músculos *soleus* incubados na presença de  $\beta$ -OH butirato 2,0mM, foram avaliadas a atividade das diferentes vias proteolíticas nessas condições. Foi verificada uma redução significativa de 27% na atividade da via dependente de ATP-Ub-proteassoma nos músculos *soleus* incubados na presença de  $\beta$ -OH butirato. No entanto, não foi observada alteração na atividade das vias lisossomal e dependente de cálcio.

Estudos mostram redução na atividade do sistema proteolítico dependente de ATP-Ub-proteassoma, por redução na expressão de diferentes componentes, em EDL (Combaret *et al.*, 1999) e gastrocnêmio de ratos portadores de sarcoma de Yoshida (Costelli *et al.* 2002), em EDL de ratos diabéticos (Baviera *et al.*, 2007) e em ratos sépticos (Combaret *et al.*, 2002) após tratamento com derivados de xantina (pentoxifilina ou torbafilina).

Mais recentemente foi demonstrado que o tratamento de ratos com clenbuterol (agonista  $\beta_2$ -adrenérgico) atenua a atrofia muscular desencadeada pela falta de gravidade (modelo de suspensão do animal pela cauda) através de redução da formação dos conjugados poliubiquitinados em músculos *plantaris* e *tibialis anterior* (Yimlamai *et al.*, 2005). Da mesma forma, Navegantes *et al.* (2006, dados não publicados) encontraram inibição na atividade proteolítica dependente de ATP-Ub-proteassoma e redução na expressão gênica de ubiquitina ligases em músculos de ratos normais incubados *in vitro* na presença de clenbuterol ou isobutilmetilxantina. Estudos são necessários para verificar se componentes da via proteolítica ATP-Ub-proteassoma poderiam estar alterados na presença de  $\beta$ -OH butirato.

Embora tenhamos encontrado um efeito agudo *in vitro* claro do ácido palmítico inibindo a proteólise, não existem informações se reduções agudas nos níveis circulantes de AGL, em situações em que esses substratos estão elevados no plasma, podem afetar diretamente a atividade das vias proteolíticas e/ou da velocidade de síntese de proteínas em músculo esquelético.

Tessari *et al.* (1986) observaram que a infusão de ácido nicotínico (um potente inibidor da lipólise no tecido adiposo) em cães jejuados, concomitantemente a uma redução de 80% nas concentrações plasmáticas de AGL, promoveu um aumento significativo na oxidação de leucina. A redução das concentrações de AGL

em indivíduos saudáveis promovida pela administração de Acipimox (um análogo do ácido nicotínico que inibe a mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo) foi capaz de aumentar a produção total de nitrogênio uréico e a excreção de uréia durante o jejum (Fery *et al.*, 1997).

Além disso, o principal achado do estudo realizado por Norrelund *et al.* (2003) foi que a inibição da lipólise por Acipimox em indivíduos saudáveis aumentou a produção de nitrogênio uréico e a degradação de proteína muscular (avaliada por fenilalanina marcada) em aproximadamente 50% e a restauração dos altos níveis de AGL pela infusão de uma emulsão de lipídios restabeleceu as concentrações proporcionais de uréia e diminuiu a degradação protéica corporal total em 10-15% (Norrelund *et al.*, 2003).

Com o objetivo de verificar se uma disponibilidade reduzida de AGL para o músculo esquelético seria capaz de alterar a atividade proteolítica nesse tecido, foram estudados ratos adultos normais e diabéticos tratados com ácido nicotínico. Foi observada uma redução significativa dos níveis plasmáticos de AGL nesses animais após 5h do início do tratamento com ácido nicotínico e, surpreendentemente, houve uma diminuição significativa na atividade proteolítica total no músculo diafragma, resultados estes diferentes daqueles obtidos em estudos anteriores, embora realizados no homem e no cão e não em modelos diabéticos (Tessari *et al.*, 1986; Fery *et al.*; 1997; Norrelund *et al.*, 2003).

A redução na proteólise muscular ocorreu concomitante a uma diminuição nos níveis de AGL para valores basais durante 5h, levando-nos a questionar se essa queda na proteólise seria decorrente do efeito do próprio ácido nicotínico. Assim, para responder a essa questão, foram realizados experimentos *in vitro* e observou-se que esta droga apresentou um efeito antiproteolítico direto em diafragma de ratos adultos diabéticos, efeito que poderia explicar a redução na proteólise observada com o tratamento *in vivo* desses animais. Contudo, não se sabe o mecanismo pelo qual o ácido nicotínico apresenta essa resposta. Não pode ser também descartada a hipótese de que esse efeito antiproteolítico *in vivo* possa ser devido à alteração promovida no metabolismo de carboidratos, ou seja, aumento da sensibilidade muscular à insulina ou da secreção desse hormônio, e conseqüente aumento da utilização de glicose pelo músculo após administração de ácido nicotínico. Como já descrito anteriormente, níveis plasmáticos elevados de AGL por longo período de tempo parecem ser um dos responsáveis por promover resistência à insulina no

músculo esquelético (observado no diabetes tipo 2) (Griffin *et al.*, 1999), tanto que a redução desses níveis parece melhorar a resposta à insulina. Estudos adicionais são necessários para elucidar estas questões.

Recentemente foram publicados trabalhos (Gerhart-Hines *et al.*, 2007; Nemoto *et al.*, 2005) a respeito do papel da nicotinamida no controle de enzimas desacetilases da família das sirtuínas (SIRT1), que regulam a atividade do PGC-1 $\alpha$ , um coativador metabólico com importante papel na manutenção da massa muscular. Assim, o uso de niacina ou ácido nicotínico poderia, além de alterar níveis de AGL, ter um efeito importante no metabolismo energético, no sentido de preservar a massa muscular via regulação da atividade de PGC-1 $\alpha$ . Estudos futuros seriam importantes para se elucidar os mecanismos pelos quais o ácido nicotínico exerce seus efeitos no controle do metabolismo.

Em resumo, os resultados do presente trabalho comprovam o efeito agudo *in vitro* anti-proteolítico do ácido palmítico e do  $\beta$ -OH butirato no músculo esquelético de ratos jovens. O ácido palmítico foi capaz de reduzir a atividade proteolítica dependente de cálcio, bem como os corpos cetônicos ( $\beta$ -OH butirato) exerceram seu efeito anti-proteolítico, por inibir a atividade da via proteolítica dependente de ATP-Ub-proteassoma. No entanto, não foram observados efeitos desses dois metabólitos no processo de síntese de proteínas totais. Entretanto, houve uma redução significativa na velocidade de síntese proteica quando a oxidação dos ácidos graxos foi inibida. Interessante foi o achado de que o efeito anti-proteolítico do ácido palmítico parece não depender de sua oxidação mitocondrial, sugerindo existir um mecanismo diferente responsável por essa ação inibitória da degradação de proteínas. Por outro lado, o tratamento de ratos diabéticos com ácido nicotínico provocou diminuição da atividade proteolítica no músculo diafragma desses animais, concomitantemente a uma redução dos níveis plasmáticos de AGL, indicando que outros fatores, além dos AGL, poderiam estar envolvidos nessa resposta, provavelmente a ação direta do ácido nicotínico no tecido muscular. Estudos adicionais são necessários para se investigar os mecanismos pelos quais o ácido palmítico e o  $\beta$ -OH butirato exercem seus efeitos no metabolismo de proteínas em músculo esquelético, bem como para se verificar o efeito de outros tipos de ácidos graxos (saturados e poliinsaturados) nos processos de síntese e degradação de proteínas, já que efeitos opostos desses metabólitos tem sido relatados na literatura.

## ***REFERÊNCIAS***

---

## 5) Referências

Alam, N.; Saggerson, E. D. Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in soleus muscle. *Biochem. J.* **334**: 233-41, 1998.

Anderson, L. V.; Davison, K.; Moss, J. A.; Richard, I.; Fardeau, M.; Tome, F. M.; Hubner, C.; Lasa, A.; Colomer, J.; Beckmann, J. S. Characterization of monoclonal antibodies to calpain 3 and protein expression in muscle from patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Am. J. Pathol.* **153**: 1169-79, 1998.

Ando H.; Watabe, H.; Valencia, J. C.; Yasumoto, K.; Furumura M.; Funasaka, Y.; Oka M.; Ichihashi M.; Hearing V. J. Fatty acids regulated pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase: a new aspect of ubiquitin-proteasome function. *J. Biol. Chem.* **279**: 15427-33, 2004.

Attaix, D.; Taillandier, D.; Combaret, L.; Kee, A. J.; Mechanisms of ubiquitination and proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle. In: *Molecular Nutrition* (Zemleni, J.; Daniel, H.), CAB International, Wallingford, Oxon, U. K., p.219-35, 2003.

Attaix, D.; Ventadour, S.; Codran, A.; Béchetm D.; Taillandier, D.; Combaret, L. The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. *Essays Biochem.* **41**: 173-86, 2005.

Baracos, V. E.; DeVivo, C.; Hoyle, D. H.; Goldberg, A. L. Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. *Am. J. Physiol.* **268**: E996-1006, 1995.

Baviera, A. M.; Zanon, N. M.; Navegantes, L. C. C.; Migliorini, R. H.; Kettelhut, I. C. Pentoxifylline inhibits Ca<sup>2+</sup>-dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**: E702-E708, 2007.

Berger, M.; Hagg, S. A.; Goodman, M. N.; Ruderman, N. B. Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Effects of starvation, diabetes, fatty acids, acetoacetate, insulin and exercise on glucose uptake and disposition. *Biochem. J.* **158**: 191-202, 1976.

Bergmeyer, H. U.; Bernt, E. In: *Bergmeyer, H. U., (ed.) Methods of enzymatic analysis*. New York, Academic Press, 1974. cap. 3, p.1205-15.

Bistrrian, B. R.; Sherman, M.; Young, V. R. The mechanism of nitrogen sparing in fasting supplemented by protein and carbohydrate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **53**: 874-8, 1981.

Blackmore, P. F.; Brumley, F. T.; Marks, J. L.; Exton, J. H. Studies on alpha-adrenergic activation of hepatic glucose output. *J. Biol. Chem.* **253**: 4851-8, 1978.

Bodine, S. C.; Latres, E.; Baumhueter, S.; Lai, V. K.; Nunez, L.; Clarke, B. A.; Poueymirou, W. T.; Panaro, F. J.; Na, E. *et al.* Identificação of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, **294**: 1704-8, 2001.

Bossola, M.; Muscaritoli, M.; Costelli, P.; Bellantone, R.; Pacelli, F.; Busquets, S.; Argiles, J.; Lopez-Soriano, F. J.; Civello, I. M.; Baccino, F. M.; Fanelli, F. R.; Doglietto, G. B. Increased muscle ubiquitin mRNA levels in gastric cancer patients. *Am. J. Physiol. – Reg. Integr. Compreh. Physiol.* **280**: R1518-R1523, 2001.

Buse, M. G.; Biggers, J. F.; Friderici, K. H.; Buse, J. F. Oxidation of branched chain amino acids by isolated hearts and diaphragms of the rats. *J. Biol. Chem.* **247**:8085-96, 1972.

Buse, M. G.; Buse, J. F. Effect of free fatty acids on protein synthesis and amino acid metabolism of isolated rat diaphragms. *Diabetes*, **16**:753-64, 1967.

Cahill, G. F. Jr. Starvation in man. *N. Engl. J. Med.* **282**: 668-75, 1970.

Carafoli, E.; Molinari, M. Calpain: A protease in search of a function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**:193-203, 1998.

Carlson, L. A. Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50<sup>th</sup> anniversary review. *J. Intern. Med.* **258**: 94-114, 2005.

Christensen, R. A.; Shtifman, A.; Allen, P. D.; Lopez, J. R.; Querfurth, H. W. Calcium dyshomeostasis in beta-amyloid and tau-bearing skeletal myotubes. *J. Biol. Chem.* **279**: 53524-32, 2004.

Ciechanover, A. Mechanisms of energy-dependent intra-cellular protein breakdown: the ubiquitin-mediated proteolytic pathway. In: *Lysosomes: their role in protein breakdown*. London, Academic Press, 561-602, 1987.

Combaret, L.; Ralliere, C.; Taillandier, D.; Tanaka, K.; Attaix, D. Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasome in muscles from tumor-bearing rats. *Mol. Biol. Rep.* **26**: 95-101, 1999.

Combaret, L.; Tilignac, T.; Claustre, A.; Voisin, L.; Taillandier, D.; Obled, C.; Tanaka, K.; Attaix, D. Torbafylline (HWA 448) inhibits enhanced skeletal muscle ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in cancer and septic rats. *Biochem. J.* **361**: 185-192, 2002.

Costelli, P.; Baccino, F. M. Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting syndromes: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **6**: 407-12, 2003.

Costelli, P.; Bossola, M.; Muscaritoli, M.; Grieco, G.; Bonelli, G.; Bellantone, R.; Doglietto, G. B.; Baccino, F. M.; Rossi-Fanelli, F. Anticytokine treatment prevents the increase in the activity of ATP-ubiquitin- and Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis systems in the muscle of tumor-bearing rats. *Cytokine*, **19**: 1-5, 2002.

Costelli, P.; Reffo, P.; Penna, F.; Autelli, R.; Bonelli, G.; Baccino, F. M. Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis in muscle wasting. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**: 2134-46, 2005.

Crozier, S. J.; Bolster, D. R.; Reiter, A. K.; Kimball, S. R.; Jefferson, L. S.  $\beta$ -oxidation of free fatty acids is required to maintain translation control of protein synthesis in heart. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **283**: E1144-E1150, 2002.

Cuervo, A. M.; Dice, J. F. Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J. Mol. Med.* **76**: 6-12, 1998.

Cuervo, A. M.; Knecht, E.; Terlecky, S. R.; Dice, J. F. Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **269**: C1200-C1208, 1995.

Dardevet, D.; Sornet, C.; Taillandier, D.; Savary, I.; Attaix, D.; Grizard, J. Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. *J. Clin. Invest.* **96**: 2113-19, 1995.

Deval, C.; Mordier, S.; Obled, C.; Bechet, D.; Combaret, L.; Attaix, D.; Ferrara, M. Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. *Biochem. J.* **360**: 143-50, 2001.

Dice, J. F. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 305-9, 1990.

Dole, V. P.; Meinertz, H. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* **235**: 2595-9, 1960.

Doretto, A. L. *Controle da degradação e da síntese de proteínas em músculo esquelético de ratos submetidos à dieta rica em proteínas*. Ribeirão Preto, 1995. 91p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Fediuc, S.; Gaidhu, M. P.; Ceddia, R. B.; Regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxilase phosphorylation by palmitate in skeletal muscle cells. *J. Lipid Res.* **47**: 412-20, 2006.

Ferrannini, E.; Barrett, E. J.; Bevilacqua, S.; Jacob, R.; Walesky, M.; Sherwin, R. S.; DeFronzo, R. A. Effect of free fatty acids on blood amino acid levels in human. *Am. J. Physiol.* **250**: E686-E694, 1986.

Fery F.; Plat, L.; Baleriaux M.; Balasse, E. O. Inhibition of lipolysis stimulates whole body glucose production and disposal in normal postabsorptive subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**: 825-30, 1997.

Fulks, R. M.; Li, J. B.; Goldberg, A. L. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J. Biol. Chem.* **250**: 290-8, 1975.

Furuno, K.; Goldberg, A. L. The activation of protein degradation in muscle by calcium or muscle injury does not involve a lysosomal mechanism. *Biochem. J.* **237**: 859-64, 1986.

Furuno, K.; Goodman, M. N.; Goldberg, A. L. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. *J. Biol. Chem.* **265**: 8550-57, 1990.

Galo, J. A. Efeitos da testosterona no metabolismo do tecido adiposo e do músculo esquelético de rato. Ribeirão Preto, 1995. 140p. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Gerhart-Hines, Z.; Rodgers, J. T.; Bare, O.; Lerin, C.; Kim, S. H.; Mostoslavsky, R.; Alt, F. W.; Wu, Z.; Puigserver, P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 $\alpha$ . *EMBO J.* **26**: 1913-23, 2007.

Goldberg, A. L.; St. John, A. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Annu. Rev. Biochem.* **45**: 747-803, 1976.

Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H.; Wel, W.; Cong, J. The calpain system. *Physiol. Rev.* **83**: 731-801, 2003.

Greenbaum, L. M.; Sutherland, J. H. Host cathepsin D response to tumor in the normal and pepstatin-treated mouse. *Canc. Res.* **43**: 2584-7, 1983.

Griffin, M. E.; Marcucci, M. J.; Cline, G. W.; Bell, K.; Barucci, N.; Lee, D.; Goodyear, L. J.; Kraegen, E. W.; White, M. F.; Shulman, G. I. Free fatty acid-induced resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* **48**: 1270-4, 1999.

Guroff, G. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.* **239**: 149-55, 1964.

Han, H. Q.; Furuno, K.; Goldberg, A. L. The activation of the ATP-dependent proteolytic system in skeletal muscle during denervation atrophy and fasting. *Fed. Proc.* **2**: A564, 1988.

Hardie, D. G.; Hawley, S. A.; Scott, J. W. AMP-activated protein kinase-development of the energy sensor concept. *J. Physiol.* **574**: 7-15, 2006.

Hardie, D. G.; Sakamoto, K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology* **21**: 48-60, 2006.

Hershko, A.; Ciechanover, A.; Rose, I. A. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytis: a component tha interacts with ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 3107-110, 1979.

Hirabara, S. M.; Carvalho, C. R. O.; Mendonça, J. R.; Haber, E. P.; Fernades, L. C.; Curi, R. Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolization (Randle cycle). *FEBS Lett.* **541**: 109-14, 2003.

Holst, D.; Luquet, S.; Nogueira, V.; Kristiansen, K.; Leverve, X.; Grimaldi, P. A. Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  in fatty acid catabolism in skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* **1633**: 43-50, 2003.

Jagoe, R. T.; Redfern, C. P. F.; Roberts, R. G.; Gibson, G. J.; Goodship, H. J. Skeletal muscle mRNA levels for cathepsin B, but not, components of the ubiquitin-proteasome pathway, are increased in patients with lung cancer referred for thoracotomy. *Clin. Sci.* **102**: 353-61, 2002.

Jefferson, L. S.; Li, J. B.; Rannels, S. R.; Regulation by insulin of amino acid release and protein turnover in the perfused rat hemicorpus. *J. Biol. Chem.* **252**: 1476-83, 1977.

Jentsch, S.; Seufert, W.; Sommer, T.; Reins, H. A. Ubiquitin-conjugating enzymes. Novel regulators of eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 195-8, 1990.

Kadowaki, M.; Kanazawa, T. Amino acids as regulators of proteolysis. *J. Nutr.* **133**: 2052S-2056S, 2003.

Kameyama, T.; Etlinger, J. D. Calcium-dependent regulation of protein synthesis and degradation in muscle. *Nature* **279**: 344-6, 1979.

Kettelhut, I. C.; Pepato, M. T.; Migliorini, R. H.; Medina, R.; Goldberg, A. L. Regulation of different proteolytic pathways in skeletal muscle in fasting and diabetes mellitus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**: 981-993, 1994.

Kettelhut, I. C.; Wing, S. S.; Goldberg, A. L. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. *Diabetes Metab. Rev.* **4**: 751-72, 1988.

Kisselev, A. F.; Akopian, T. N.; Woo, K. M.; Goldberg, A. L. The sizes of peptides generated from protein by Mammalian 26S and 20S proteasomes. *J. Biol. Chem.* **274**: 3363-71, 1999.

Klausner, R. D.; Kleinfeld, A. M.; Hoover, R. L.; Karnovsky, M. J. Lipid domains in membranes. Evidence derived from structural perturbations induced by free fatty acids and lifetime heterogeneity analysis. *J. Biol. Chem.* **255**: 1286-95, 1980.

Lang, C. H. Elevated plasma free fatty acids decrease basal protein synthesis, but not the anabolic effect of leucine, in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **291**: 666-74, 2006.

Lecker, S. H.; Solomon, V.; Mitch, W. E.; Goldberg, A. L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Nutr.* **129**: 227S-237S, 1999.

Li, J. B.; Goldberg, A. L. Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **231**: 441-8, 1976.

Ma, S. W. Y.; Foster, D. O. Starvation-induced changes in metabolic rate, blood flow, and regional energy expenditure in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **64**: 1252-58, 1986.

Merrill, G. F.; Kurth, E. J.; Hardie, D. G.; Winder, W. W. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **273**:1107-12, 1997.

Miles, J. M.; Nissen, S. L.; Rizza, R. A.; Gerich, J. E.; Haymond, M. W. Failure of infused beta-hydroxybutyrate to decrease proteolysis in man. *Diabetes*, **32**: 197-205, 1983.

Mitch, W. E.; Price, S. R. Mechanisms activated by kidney disease and the loss of muscle mass. *Am. J. Kid. Dis.* **38**: 1337-42, 2001.

Morillas, M.; Clotet, J.; Rubí, B.; Serra, D.; Ariño, J.; Hegardt, F. G.; Asins, G. Inhibition by etomoxir of rat liver carnitine octanoyltransferase is produced through the co-ordinate interaction with two histidine residues. *Biochem. J.* **351**: 495-502, 2000.

Mortimore, G. E. Mechanisms of cellular protein catabolism. *Nutr. Rev.* **40**: 1-12, 1982.

Nakamura, M.; Inomata, M.; Hayashi, M.; Imahori, K.; Kawashima, S. Purification and characterization of an inhibitor of CANP from rabbit skeletal muscle: purification of a 50.000 dalton inhibitor. *J. Biochem.* **96**: 1399-407, 1984.

Nair, K. S.; Welle, S. L.; Halliday, D.; Campbell, R. G. Effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate on whole-body leucine kinetics and fractional mixed skeletal muscle protein synthesis in humans. *J. Clin. Invest.* **82**: 198-205, 1988.

Navegantes, L. C.; Resano, N. M.; Baviera, A. M.; Migliorini, R. H.; Kettelhut, I. C. CL 316,243, a selective beta3-adrenergic agonist, inhibits protein breakdown in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.* **451**: 617-24, 2006.

Navegantes, L. C.; Resano, N. M.; Migliorini, R. H.; Kettelhut, I. C. Catecholamines inhibit  $Ca^{2+}$ -dependent proteolysis in rat skeletal muscle through  $\beta_2$ -adrenoceptors and cAMP. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**: E449-E454, 2001.

Navegantes, L. C.; Resano, N. M.; Migliorini, R. H.; Kettelhut, I. C. Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **277**: E883-E889, 1999.

Nemoto, S.; Fergusson, M. M.; Finkel, T. SIRT1 Functionally Interacts with the Metabolic Regulator and Transcriptional Coactivator PGC-1 $\alpha$ \*. *J. Biol. Chem.* **280**: 16456-60, 2005.

Nielsen, S.; Jorgensen, J. O. L.; Hartmund, T.; Norrelund, H.; Nair, K. S.; Christiansen, J. S.; Moller, N. Effects of lowering circulating free fatty acid levels on protein metabolism in adult growth hormone deficient patients. *G. H. IGF Research* **12**: 425-33, 2002.

Nixon, R. A. The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res. Rev.* **2**:407-18, 2003.

Norrelund, H.; Nair, K. S.; Nielsen, S.; Frystyk, J.; Ivarsen, P.; Jorgensen, J. O. L.; Christiansen, J.S.; Moller, N. The decisive role of free fatty acids for protein conservation during fasting in humans with and without growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**: 4371-78, 2003.

Oakes, N. D.; Kjellstedt, A.; Forsberg, G.; Clementz, T.; Camejo, G.; Furler, S. M.; Kraegen, E. W.; Ölwegård-Halvarsson, M.; Jenkins, A. B. Development and initial evaluation of a novel method for assessing tissue-specific plasma free fatty acid utilization in vivo using (R)-2-bromopalmitate tracer. *J. Lip. Res.* **40**: 1155-69, 1999.

Otsuka, Y.; Goll, D. E. Purification of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase. *J. Biol. Chem.* **262**: 5839-51, 1987.

Owen, O. E.; Morgan, A. P.; Kemp, H. G.; Sullivan, J. M.; Herrera, H. G.; Cahill, G. F. Jr. Brain metabolism during fasting. *J. Clin. Invest.* **46**: 1589-95, 1967.

Pal, G. P.; Elce, J. S.; Jia, Z. Dissociation and aggregation of calpain in the presence of calcium. *J. Biol. Chem.* **276**: 47233-8, 2001.

Palaiologos, G.; Felig, P. Effects of ketone bodies on aminoacid metabolism in isolated rat diaphragm. *Biochem. J.* **154**: 709-16, 1976.

Pawan, G. L. S.; Semple, S. J. G. Effect of 3-hydroxybutyrate in obese subjects on very-low-energy diets and during therapeutic starvation. *Lancet.* i: 15-17, 1983.

Pepato, M. T.; Migliorini, R. H.; Goldberg, A. L.; Kettelhut, I. C. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. *Am. J. Physiol.* **271**: E340-E347, 1996.

Price, S. R. Increased transcription of ubiquitin-proteasome system components: molecular responses associated with muscle atrophy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 617-28, 2003.

Rannels, D. E.; Jefferson, L. S.; Hjalmarson, A. C.; Wolpert, E. B.; Morgan, H. E. Maintenance of protein synthesis in hearts of diabetic animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**: 1110-6, 1975.

Renaud, G.; Bouma, M. E.; Foliot, A.; Infante, R. Free fatty-acid uptake by isolated rat hepatocytes. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **93**: 313-9, 1985.

Rodemann, H. P.; Waxman, L.; Goldberg, A. L. The stimulation of protein degradation in muscle by  $Ca^{2+}$  is mediated by prostaglandin  $E_2$  and does not require the calcium-activated protease *J. Biol. Chem.* **257**: 8716-23, 1982.

Rupp, H.; Zarain-Herzberg, A.; Maisch, B. The use of partial fatty acid oxidation inhibitors for metabolic therapy of angina pectoris and heart-failure. *Herz.* **27**: 621-36, 2002.

Scharff, R.; Wool, I. G. Effect of diabetes on the concentration of amino acids in plasma and heart muscle of rats. *Biochem. J.* **99**: 173-8, 1966.

Sherwin, R. S.; Hendler, R. G.; Felig, P. Effect of ketone infusions on amino acid and nitrogen metabolism in man. *J. Clin. Invest.* **55**: 1382-90, 1975.

Shiraha, H.; Glading, A.; Chou, J.; Jia, Z.; Wells, A. Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol. Cell Biol.* **22**: 2716-27, 2002.

Sorimachi, H.; Imajoh, S.; Emori, Y.; Kawasaki, H.; Ohno, S.; Minami, Y.; Suzuki, K. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both  $\mu$ - and m-types: specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **264**: 20106-11, 1989.

Sorimachi, H.; Kimura, S.; Kinbara, K.; Kazama, J.; Takahashi, M.; Yajima, H.; Ishiura, S.; Sasagawa, N.; Nonaka, I.; Sugita, H.; Muruyama, K.; Suzuki, K. Structure and physiological functions of ubiquitous and tissue-specific calpain species. *Adv. Biophys.* **33**: 101-122, 1996.

Strobl, S.; Fernandez-Catalan, C.; Braun, M.; Huber, R.; Masumoto, H.; Nakagawa, K. et al. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 588-92, 2000.

Suzuki, K.; Hata, S.; Kawabata, Y.; Sorimachi, H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*. **53**: S12-S18, 2004.

Tanaka, T.; Yamamoto, J.; Iwasaki, S.; Asaba, H.; Hamura, H.; Ikeda, Y.; Watanabe, M.; Magoori, K.; Ioka, R. X.; Tachibana, K.; Watanabe, Y.; Uchiyama, Y.; Sumi, K.; Iguchi, H.; Ito, S.; Doi, T.; Hamakubo, T.; Naito, M.; Auwerx, J.; Yanagisawa, M.; Kodama, T.; Sakai, J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  induces fatty acid  $\beta$ -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 15924-9, 2003.

Tenenbaum, A.; Motro, M.; Fisman, E. Z. Dual and pan-peroxisome proliferators-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. *Cardiov. Diab.* **4**: 1-5, 2005.

Tessari, P.; Nissen, S. L.; Miles, J. M.; Haymon, M. W. Inverse relationship of leucine flux and oxidation to free fatty acid availability in vivo. *J. Clin. Invest.* **77**: 575-81, 1986.

Tischler, M. E.; Rosenberg, S.; Saturug, S.; Henriksen, E. J.; Kirby, C. R.; Tome, M.; Chase, P. Different mechanisms of increased proteolysis in atrophy induced by denervation or unweighting of rat soleus muscle. *Metabolism*. **39**: 756-63, 1990.

Tisdale, M. J. Wasting in cancer. *J. Nutr.* **129**: 243-6S, 1999.

Yimlamai, T.; Dodd, S. L.; Borst, S. E.; Park, S. Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Appl. Physiol.* **99**: 71-80, 2005.

Waalkes, T. P.; Udenfriend, S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J. Lab. Clin. Med.* **50**: 733-6, 1957.

Walker, M.; Shmueli, E.; Daley, S. E.; Cooper, G.; Alberti, K. G. M. M. Do nonesterified fatty acids regulate skeletal muscle turnover in humans *Am. J. Physiol.* **265**: E357-E361, 1993.

Whitehouse, A. S.; Smith, H. J.; Drake, J. L.; Tisdale, M. J. Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. *Canc. Res.* **61**: 3604-9, 2001.

Williams, A. B.; Decourten-Myers, G. M.; Fischer, J. E.; Luo, G.; Sun, X.; Hasselgren, P. O. Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. *FASEB J.* **13**: 1435-43, 1999.

Williamson, D. H.; Farrell, R.; Kerr, A.; Smith, R. Muscle-protein catabolism after injury in man, as measured by urinary excretion of 3-methylhistidine. *Clin. Sci. Mol. Med.* **52**: 527-33, 1977.

Wu, G.; Thompson, J. R. The effect of ketone bodies on protein turnover in isolated skeletal muscle from the fed and fasted chick. *Int. J. Biochem.* **22**: 263-8, 1990.

Zhou, Q.; Du, J.; Hu, Z.; Walsh, K.; Wang X. H. Evidence for Adipose-Muscle Crosstalk: Opposing Regulation of Muscle Proteolysis by Adiponectin and Fatty Acids. *Endocrinology*, 2007 (*In Press*).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)