

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

THIAGO DE LORENA FÁBIO

**Efeitos da hipóxia intermitente crônica no
metabolismo de proteínas em músculos
esqueléticos de ratos**

Ribeirão Preto

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

THIAGO DE LORENA FÁBIO

**Efeitos da hipóxia intermitente crônica no
metabolismo de proteínas em músculos
esqueléticos de ratos**

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia
Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Fábio, Thiago de Lorena

Efeitos da hipóxia intermitente crônica no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos/Thiago de Lorena Fábio; orientador Luiz Carlos Carvalho Navegantes. – Ribeirão Preto, 2009.

90f. 30cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. Área de concentração: Fisiologia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Hipóxia. 2. Músculo esquelético. 3. Sistemas proteolíticos. 4. Síntese protéica. 5. Síndrome da apnéia do sono.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Cleuti Fábio e Maria Carolina de Lorena Fábio que sempre me apoiaram e me deram a 'base' estrutural e emocional para conquistar todos meus objetivos. São, sem dúvida, meus maiores exemplos de honestidade, lealdade, garra e amor! Sem eles, nada disso teria sido possível. Sou fã incondicional. AMO VCS DEMAIS!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Navegantes, que acreditou no meu trabalho e foi sempre solícito, atencioso, paciente e perfeccionista convicto. Mesmo nas horas em que fraquejei e achava que não conseguiria, ele instigou a vontade pelo conhecimento. Com ele aprendi o verdadeiro espírito do 'ser' científico;

A Neusa Maria Zanon e a Elza Aparecida Filipin (Pila) pelas proteólises, sínteses e oxidações. Se não fosse pelos seus trabalhos exímios e pela determinação, essa dissertação simplesmente não teria acontecido;

A Maria Antonieta Garófalo por me estimular a ter perseverança no HPLC e por toda a paciência na explicação das diluições que para mim era russo!; ao Victor Diaz Galban que muito me ajudou com os sistemas de informática e me ensinou os 'macetes' para eu baixar os artigos que gostaria.

Ao Dawit Gonçalves que me ensinou os meandros do western blot e sempre me influenciou com seu entusiasmo e seu excelente trabalho; e também pelas ótimas gargalhadas e discussões filosóficas nas aulas de inglês!

Ao Eduardo Lira que sempre mostrou afinco pelo que faz e que me deu vários exemplos de 'ser' político e íntegro!!!

Ao Willian Silveira, pela imensa ajuda nos experimentos de proteólise e oxidação de glicose e por estar sempre disposto a discutir e somar com o meu trabalho!

A Flavinha Graça, por todas nossas discussões frutíferas, gargalhadas e brigas.

A Sílvia de Paula pelo exemplo de dedicação, trabalho árduo, determinação e por todos os ensinamentos nos experimentos de Western.

A Luciana Carvalho por toda sua gentileza, pelos sustos pregados e pela ajuda na determinação dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres.

A Lidiany Góis pela ajuda nos experimentos de oxidação de glicose e palmitado e pela sua sinceridade nas discussões científicas e extra-científicas.

A todos meus colegas do Laboratório de Controle do Metabolismo dos Departamentos de Fisiologia e Bioquímica : Danúbia Frasson, Valéria Ernestânia, Priscila Cassolla, Leandro Manfredi e Rafael R. Valentim,

Ao apoio financeiro da CAPES e FAPESP.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Benedito Honório Machado, que possibilitou a realização deste trabalho através da colaboração com o Laboratório de Controle do Metabolismo, concedendo a utilização das câmaras para a indução da hipóxia;

À Prof^a. Dra. Ísis do Carmo Kettelhut pelo inestimável suporte no laboratório e enorme contribuição científica para o meu trabalho, através de seus apontamentos precisos de relevância fundamental;

Ao Prof. Dr. Renato Helios Migliorini, *in memoriam*, por ter construído as 'bases estruturais' da Pós Graduação da USP de Ribeirão Preto, por ter sido um pesquisador brilhante e por formar grande parte dos pesquisadores exímios na área do Controle do Metabolismo no Brasil;

À Leni G. H. Bonagamba pela imensa ajuda com os animais durante todos os experimentos da hipóxia, troca de comedouros e por ser sempre prestativa e gentil;

Ao Daniel Zoccal pelas discussões importantes sobre o aparato da hipóxia e pelas vezes que me ajudou com os animais nos domingos e feriados;

À Profa. Dra. Cláudia Ferreria da Rosa Sobreira pela colaboração nos experimentos de histologia e morfometria do músculo esquelético e pelas discussões dos resultados dos mesmos.

Aos Prof^{os} Drs. Lucila Leico Kagohara Elias e Ubiratan Fabres Machado pelas contribuições críticas e valorosas à forma final da minha dissertação.

“Sábio é aquele que conhece os limites
da própria ignorância.”

(Sócrates)

RESUMO

FÁBIO, TL. Efeitos da hipóxia intermitente crônica no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos. Ribeirão Preto, 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O objetivo principal do presente estudo foi investigar os efeitos da hipóxia crônica intermitente (HIC) no metabolismo de proteínas em músculos esquelético de ratos jovens. Considerando que a hipóxia é uma situação que afeta todo o metabolismo celular, avaliou-se também as possíveis alterações do metabolismo de carboidratos e lipídios na musculatura esquelética. Para isso, ratos de aproximadamente 3 semanas foram expostos a 9 dias de HIC (6% O₂ durante 40s em intervalos de 9 min; 8 h por dia). No décimo dia, o grupo HIC desenvolveu hipertrofia cardíaca e aumentou o conteúdo de dopamina na glândula adrenal sugerindo hiperatividade simpática. A massa corporal dos animais hipóxicos foi menor que a dos animais controles e este efeito foi associado à redução da massa muscular esquelética, à atrofia das fibras tipo IIa/I e IIa nos músculos *soleus* e à menor velocidade de síntese protéica tanto no músculo *soleus* quanto no EDL. O grupo de animais hipóxicos apresentou menores valores da proteólise total, diminuição na atividade da proteólise Ca⁺²-dependente e aumento no conteúdo protéico da forma autolisada (ativa) da μ -calpaína e da calpastatina, o inibidor endógeno das calpaínas. Além disso, o presente estudo mostra que a HIC resultou em aumento do conteúdo de glicogênio hepático e muscular (*soleus*) e redução da oxidação de glicose em músculos *soleus* e EDL. Paralelamente, a HIC aumentou a oxidação de ácidos graxos pelos músculos esqueléticos incubados na presença de insulina e a atividade enzimática de dois componentes da cadeia respiratória mitocondrial (complexos III e IV). Esses dados sugerem que a atividade simpática aumentada dos ratos jovens submetidos à HIC inibiu a proteólise

Ca⁺²-dependente nos músculos *soleus* devido ao aumento dos níveis de calpastatina. Esse efeito antiproteolítico parece ser um importante mecanismo de atenuação da perda de massa muscular esquelética oxidativa e da perda adicional da massa corporal, em um período crítico do desenvolvimento do animal. Nossos dados também indicam que a HIC induz adaptações metabólicas que possibilitam maior aproveitamento dos ácidos graxos como fonte de energia, ao mesmo tempo que a glicose é desviada para a síntese de glicogênio.

ABSTRACT

FÁBIO, TL. Effects of chronic intermittent hypoxia on skeletal muscle protein metabolism in rats. 2009. 90 p. Dissertation (Master degree) School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The main goal of the present study was to investigate the effects of chronic intermittent hypoxia (CIH) on protein metabolism in skeletal muscles from juvenile rats. Considering that hypoxia is a stimulus that affects the whole metabolism, we have also investigated the possible changes that occur in muscle carbohydrate and lipid metabolism. For this, 3-week-old rats were exposed to 9 days of CIH (6% O₂ for 40s at 9 min intervals; 8h·day⁻¹). On the 10th day CIH rats developed cardiac hypertrophy with a higher content of dopamine in adrenal gland suggesting sympathetic hyperactivity. The body weight of CIH rats was smaller than control and this effect was associated with a loss of skeletal muscle mass, an atrophy of type IIa/I and IIA fibers in *soleus* muscle, and lower *in vitro* rates of protein synthesis in both *soleus* and EDL. The CIH group exhibited lower rates of overall proteolysis, which were accompanied by a decreased activity of Ca²⁺-dependent proteolysis and an increase in the protein content of autolyzed μ -calpain and calpastatin, the endogenous inhibitor of calpains. Regarding carbohydrate and lipid metabolism, the present study shows that the CIH-induced improvement of glycogen in liver and *soleus* muscle was associated with lower rates of muscle glucose oxidation. Furthermore, CIH increased the fatty acid oxidation in skeletal muscles incubated in the presence of insulin and the activity of two components of respiratory chain (complex III and IV). These data suggest that the enhanced sympathetic activity of juvenile rats submitted to CIH inhibits the Ca²⁺-dependent proteolysis in *soleus* muscles by increasing calpastatin levels. This antiproteolytic effect may prevent muscle mass wasting,

mainly in oxidative muscles such as *soleus*, and additional loss of body weight on this critical period of the development. In addition, CIH induces metabolic adaptations that lead to a shift from carbohydrate metabolism to fat metabolism in skeletal muscle. As a result, the content of muscle glycogen is preserved.

LISTA DE SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
AICAR	Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
Ca ⁺²	Cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase do tipo 1
CRE	Elemento responsivo ao AMPc
CREB	Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
DTT	Ditiotreitol
E3	Enzima ligante de Ub
E64	Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano
EDL	Extensor digitorum longus
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eIF	Fator eucariótico de iniciação
eIF2- α	Subunidade α do fator de iniciação da tradução 2
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio

FI _{O2}	Fração inspirada de oxigênio
GLUT4	Transportador de glicose do tipo 4
HIC	Hipóxia intermitente crônica
HIF-1	<i>Hypoxia inducible factor</i>
KOH	Hidróxido de potássio
MC	Massa corporal
MG132	N-carboxibenzoxi-Leu-Leu-Leucinal
mTOR	Proteína alvo da rapamicina de mamíferos
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NTS	Núcleo do trato solitário
N ₂	Nitrogênio
Pa _{O2}	Pressão arterial de oxigênio
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
RVLM	<i>Rostro ventro lateral medula</i>
RNA _m	RNA mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
Ub	Ubiquitina

SUMÁRIO

1– Introdução.....	1
Hipóxia e metabolismo.....	3
Hipóxia e metabolismo muscular.....	6
2– Objetivos.....	12
2.1. Principal.....	12
2.2. Específicos.....	11
3–Materiais e Métodos.....	14
3.1. Animais.....	14
3.2. Hipóxia Intermitente Crônica.	14
3.3. Massa corporal e ingestão alimentar	15
3.4. Análise morfométrica dos músculos esqueléticos	16
3.5. Concentrações de catecolaminas no plasma, adrenal e músculo esquelético.....	16
3.6. Proteólise em músculos isolados	17
3.6.1. <i>Atividade proteolítica</i>	18
3.7. Conteúdo protéico dos comp do sistema proteolítico dependente de Ca ⁺²	19
3.7.1. <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)</i>	19
3.7.2. <i>Western blot</i>	20
3.8. Síntese total de proteínas musculares	21
3.9. Oxidação de glicose e palmitato ..	22

3.10. Atividades enzimáticas da citrato sintase	
e dos complexos da cadeia respiratória.....	24
3.10.1. Citrato Sintase	24
3.10.2. Complexo I da cadeia respiratória	25
3.10.3. Complexo II da cadeia respiratória	25
3.10.4. Complexo III da cadeia respiratória	26
3.10.5. Complexo IV da cadeia respiratória	26
3.11. Análises bioquímicas	27
3.12. Glicogênio hepático e muscular	27
3.13. Análise Estatística	28
4 – Resultados	29
4.1. Curva de crescimento corporal, ingestão alimentar, massa dos tecidos e morfometria da musculatura esquelética.....	29
4.2. Concentrações plasmáticas e teciduais de catecolaminas	32
4.3. Parâmetros metabólicos e hormonais	35
4.4. Velocidade de síntese e degradação total de proteínas musculares	37
4.5. Atividades dos sistemas proteolíticos em músculos esqueléticos	39
4.6. Conteúdo protéico dos componentes da via Ca ⁺² -dependente em músculos <i>soleus</i>	40
4.7. Conteúdo protéico dos conjugados poli-ubiquitinados e da subunidade C2 do proteassoma em músculos EDL	42
4.8. Oxidação de glicose e palmitato pelos músculos esqueléticos	43
4.9. Atividades enzimáticas dos componentes protéicos da cadeia respiratória de músculos <i>soleus</i>	46
5 – Discussão.....	48

6 – Conclusões	67
7 – Referências Bibliográficas	68

1. Introdução

A hipóxia tecidual ocorre quando o suprimento de oxigênio (O_2) para os tecidos é incapaz de satisfazer a demanda celular. Dependendo de sua origem, a hipóxia tecidual pode ser classificada em: 1) Hipóxia hipóxica: causada por uma baixa tensão de oxigênio (Pa_{O_2}) no sangue arterial (ex: exposição às altas altitudes, doença pulmonar, síndrome da apnéia obstrutiva do sono, etc.); 2) Hipóxia anêmica: causada por uma capacidade reduzida do sangue em transportar O_2 (ex: anemia, envenenamento por monóxido de carbono, etc.); 3) Hipóxia circulatória: causada por uma redução do fluxo sanguíneo tecidual, seja generalizada, como no choque, ou local, como no caso das obstruções dos vasos e do shunt arteriovenoso e 4) Hipóxia histotóxica: causada por substâncias tóxicas como, por exemplo, o cianeto que interfere diretamente com o consumo de O_2 pelos tecidos (PALMA et al., 2006; WEST, 1986).

Independentemente do fator etiológico, toda condição hipóxica leva à estimulação dos quimiorreceptores arteriais periféricos. Estes receptores consistem em estruturas pequenas, altamente vascularizadas, localizadas na região do arco aórtico e medialmente aos seios carotídeos, cuja estimulação química pela baixa Pa_{O_2} no sangue arterial resulta em aumento na atividade das fibras nervosas aferentes, estimulação de áreas centrais no bulbo e ativação reflexa do sistema nervoso simpático. Está muito bem demonstrado que um grupo de neurônios bulbo-espinhais localizados na parte rostral ventrolateral do bulbo, o RVLM, contendo neurônios glutamatérgicos, são a maior fonte de neurônios simpáticos pré-ganglionares excitatórios para a coluna intermédio-lateral da coluna espinal. Esse conceito é suportado por observações que a inibição farmacológica do RVLM, em roedores, induz uma grande queda na atividade

simpática e, conseqüentemente, na pressão arterial. Além disso, aferências periféricas dos quimiorreceptores arteriais, que detectam baixas tensões de O_2 estabelecem suas primeiras sinapses no NTS (núcleo do trato solitário) comissural, o qual ativa diretamente neurônios do RVLM, evocando uma potente resposta simpato-excitatória. (ZOCCAL et al., 2009).

As respostas sistêmicas decorrentes da hipóxia dependerão do tempo de exposição à baixa tensão de oxigênio. Por exemplo, quando o ser humano é exposto, agudamente, a graus moderados de hipóxia, a frequência cardíaca, o débito cardíaco e a contratilidade miocárdica geralmente são aumentados, sendo todas estas alterações, em grande parte, abolidas pelo tratamento com antagonistas dos receptores β -adrenérgicos (HANADA et al., 2003). Por outro lado, indivíduos que permanecem em altas altitudes por longo período de tempo tornam-se cada vez mais adaptadas à baixa PaO_2 , de tal forma que possam sobreviver sem os efeitos deletérios da hipóxia crônica. Os principais mecanismos envolvidos na aclimação a ambientes hipóxicos são o aumento da ventilação pulmonar acompanhada de uma alta capacidade de difusão dos gases, número aumentado de hemácias, vascularização aumentada dos tecidos e a maior capacidade da utilização de oxigênio pelas células dos tecidos (BERNE et al., 2004). Enquanto os sistemas fisiológicos adaptam-se muito bem à hipóxia crônica contínua (BUNN & POITON, 1996; SEMENZA, 1999), pessoas submetidas à hipóxia crônica intermitente (HIC) causadas por apnéias noturnas exibem considerável morbidade e mortalidade e são propensas a desenvolver hipertensão, infartos do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (NIETO et al., 2000; SHAHAR et al., 2001). Indivíduos que apresentam hipóxia intermitente devido às apnéias recorrentes

exibem pressão sanguínea elevada e aumento da atividade do nervo simpático (KARA et al., 2003). Sabendo-se que apnéias são associadas não apenas com redução da tensão de O₂, mas também com hipercapnia (aumento das concentrações sanguíneas de CO₂), modelos com animais experimentais têm sido empregados para demonstrar que a hipóxia *per se* promove o aumento da pressão sanguínea através da atividade simpática aumentada, independentemente da produção de CO₂ (FLETCHER, 2001).

Quando ratos são expostos à HIC, observa-se o mesmo padrão de resposta de pacientes com apnéia obstrutiva do sono, ou seja, aumento da atividade simpática e hipertensão arterial (SICA et al., 2000; CUTLER et al., 2004). Foi também demonstrado aumento do efluxo de catecolaminas da medula da adrenal de ratos adultos expostos à hipóxia intermitente (KURI et al., 2007). O aumento da pressão arterial observado nesses animais é abolido pela adrenalectomia, o que demonstra o papel fundamental da liberação de catecolaminas da medula da adrenal para o efeito pressórico da hipóxia intermitente crônica (FLETCHER, 1997). ZOCCAL et al. (2007) também demonstraram que o aumento da pressão arterial média observado em ratos submetidos à HIC era dependente da inervação simpática uma vez que este efeito era abolido pelo tratamento com hexametônio, um bloqueador ganglionar simpático.

Hipóxia e metabolismo

A hipóxia desencadeia um sinal de transdução intracelular que orchestra uma série de processos metabólicos de defesas intracelulares que tornam o indivíduo mais tolerante à baixa tensão de O₂. O declínio da síntese protéica e da atividade da bomba de sódio/potássio são dois eventos que reduzem a demanda de ATP para a célula e

contribuem, conjuntamente, para a maioria das economias energéticas que se seguem à redução do *turnover* de ATP durante a hipóxia (HOCHACHKA et al., 1996). O declínio da biossíntese protéica global induzido pela hipóxia é, em parte, devido à inibição de moléculas chaves envolvidas com a sinalização da tradução protéica como, por exemplo, o eIF2- α (kinase ativadora de eEF2), eEF2 (fator de alongação da tradução) e a mTOR (marcador de rapamicina em mamíferos que fosforila proteínas *downstream* responsáveis por aumento de biogênese ribossomal) (LIU et al., 2006).

A tolerância à hipóxia também depende da ativação de fatores de transcrição (sensíveis à diminuição da tensão de O₂) que têm como função regular a expressão de um conjunto de genes alvos. Entre estes fatores de transcrição, o mais importante parece ser o HIF-1 (fator de transcrição induzido por hipóxia). O HIF-1 é um fator transcricional heterodimérico e consiste de uma subunidade α , regulada por oxigênio, e uma subunidade β , constitutivamente expressa. O HIF-1 α é regulado principalmente pela tensão de O₂, através da degradação oxigênio-dependente da sua subunidade α . Em condições normóxicas, o HIF-1 α é reconhecido e ubiquitinado por uma E3 ligase (enzima de ubiquitinação que “marca” as proteínas a serem degradadas pelo complexo multi-enzimático do proteassoma) e, em seguida, degradado pelo sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma. Para que o HIF-1 α seja ubiquitinado é necessário que ele seja, inicialmente, hidroxilado em resíduos de prolina pela ação da prolil-hidroxilase (PH), uma reação enzimática que requer O₂ como co-substrato e ferro (Fe²⁺) como co-fator. (JAAKKOLA et al., 2001). Por outro lado, em situações hipóxicas, o HIF-1 α é estabilizado e inicia uma série de eventos intracelulares que incluem translocação nuclear, dimerização com a subunidade HIF-1 β , recrutamento de coativadores

transcricionais e subsequente ligação aos genes alvos responsivos à hipóxia. Entre estes podemos citar os genes envolvidos com angiogênese, eritropoese, glicólise, metabolismo do ferro e apoptose (CANDINAS et al., 2001). Todas essas respostas fazem parte de extensa reprogramação da célula normóxica para a geração de uma célula mais tolerante à hipóxia. (HOCHACHKA et al., 1996).

Além dos fatores de transcrição induzidos pela hipóxia, é bem estabelecido que a AMPK (proteína quinase ativada por AMP) é um regulador crítico do metabolismo intermediário em situações de baixa produção de ATP. Todas as ações mediadas por essa enzima direcionam-se no sentido de favorecer a economia energética pelas células. Entre essas, podemos citar as ações clássicas da AMPK na inibição da síntese protéica, no aumento da oxidação lipídica, na captação de glicose, no aumento da biogênese mitocondrial e na ativação transcricional de genes metabólicos em músculo esquelético de humanos. (ZIERATH et al., 2008).

Sabe-se que diminuições na relação ATP:ADP levam ao aumento da geração de AMP intracelular e este por sua vez induz a fosforilação e ativação da AMPK por proteínas *upstream* como a LKB1, um clássico supressor tumoral, e a quinase dependente de Ca^{+2} -calmodulina (HARDIE, 2008). No entanto, estudos em fibroblastos demonstram que, na hipóxia, não ocorrem alterações na relação ATP:ADP e a AMPK é ativada diretamente pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas no complexo III da mitocôndria (EMERLING et al., 2009). De fato, outros estudos têm demonstrado que a hipóxia aumenta o estresse oxidativo devido à geração de ERO pela mitocôndria (PALMA et al., 2006). Assim, as ERO liberadas pela mitocôndria contribuem tanto para o aumento do Ca^{+2} intracelular (HIDALGO & DONOSO, 2008;

HIDALGO et al., 2002, 2004) como para a ativação de intermediários intracelulares como a AMPK. EMERLING et al. (2009) demonstraram, em fibroblastos de camundongo, que as ERO podem ativar a AMPK tanto diretamente como indiretamente via LBK1. Além disso, o HIF-1 também é ativado devido à liberação de ERO, principalmente do CIII mitocondrial, independentemente da AMPK. (EMERLING et al., 2007).

Hipóxia e metabolismo muscular

Tendo em vista que a musculatura esquelética representa cerca de 40% do peso corporal do organismo humano e é diretamente innervado por fibras pós-ganglionares simpáticas (BARKER & SAITO, 1981), é razoável supor que este tecido seja diretamente afetado pela hipóxia. De fato, em estudos de eletromiografia, foi verificado um aumento significativo na atividade simpática muscular em indivíduos submetidos à hipóxia aguda (FAUCHER et al., 2004). O aumento do tônus simpático muscular em resposta à hipóxia é um ajuste circulatório importante para manter a vasoconstrição das arteríolas e com isso aumentar a resistência periférica e o débito cardíaco, garantindo uma melhor redistribuição do sangue arterial para tecidos nobres.

O metabolismo muscular também é profundamente alterado pela hipóxia. Sabe-se que a principal fonte de energia para as células durante um evento hipóxico agudo é obtida a partir da ativação da glicólise, isto é, do desdobramento do glicogênio das células em piruvato, que por sua vez é convertido em ácido láctico (GUYTON, 1996). O aumento da glicólise anaeróbica é uma importante estratégia de adaptação celular à hipóxia, especialmente em tecidos excitáveis como o cérebro, o coração e músculo

esquelético visto que a homeostasia iônica e a integridade funcional destes tecidos são dependentes de um constante suprimento de energia.

A ativação máxima da captação e o transporte de glicose pelo músculo esquelético são também estimulados pela HIC (CHIU et al., 2004). O aumento da atividade de transporte de glicose muscular induzida pela hipóxia é resultante da maior translocação para o sarcolema dos transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4) (NIKLASSON et al., 2000). A modulação dos GLUTs pela hipóxia depende do estágio de vida do animal. Diferentemente dos animais adultos, ratos Sprague-Dawley de apenas 3 dias apresentaram um aumento do conteúdo da proteína GLUT em resposta à diminuição de O₂, tanto no coração como em músculos esqueléticos (XIA et al., 1997). Estes efeitos parecem ser mediados por uma via dependente de Ca⁺², mas independente da insulina, uma vez que são observados em situações de deficiência insulínica como o diabetes (NIKLASSON et al., 2000) e podem ser bloqueados por inibidores tanto do retículo sarcoplasmático (liberador de Ca⁺²) como da proteína quinase dependente de Ca⁺²-calmodulina (WRIGHT et al., 2005). Em conjunto, estas evidências experimentais indicam que o uso anaeróbico da glicose e a regulação do GLUT em um tecido metabolicamente importante como o músculo esquelético são partes de uma estratégia global de adaptação à privação de O₂ (XIA et al., 1997).

Embora os ajustes cardiovasculares, respiratórios e metabólicos resultantes da ativação do reflexo simpático em situações de hipóxia aguda sejam relativamente bem conhecidos, muito pouco se sabe acerca das alterações que ocorrem no metabolismo intermediário, e mais especificamente, no controle do metabolismo de proteínas em estados mais prolongados de hipóxia.

A hipóxia crônica é efetiva em reduzir a atividade enzimática das vias oxidativas, o número de mitocôndrias e aumentar a conversão de fibras musculares oxidativas em glicolíticas. (FAUCHER et al., 2004). Diferentes estudos têm mostrado que ocorre redução significativa da massa muscular em humanos submetidos à hipóxia crônica. Como consequência, a área da fibra muscular é reduzida com aumento proporcional da densidade capilar. No entanto, os mecanismos intracelulares responsáveis pela perda de massa muscular nessas condições ainda não foram elucidados.

Toda redução de massa muscular é resultante de um aumento da degradação de proteínas e/ou da redução da síntese protéica. Estudos clássicos mostram que a hipóxia e/ou anóxia inibe a síntese protéica em diafragmas isolados de ratos (MANCHESTER & YOUNG, 1959). Outros estudos demonstraram que a hipóxia aguda inibe a síntese protéica em músculos gastrocnêmios de ratos, sendo a fração de proteínas miofibrilares a mais comprometida (PREEDY & SUGDEN, 1989). Isto pode explicar a disfunção das proteínas contráteis que se tem reportado nestas condições (OTTENHEIJM et al., 2005). MORRISON et al. (1988) determinaram as concentrações artério-venosas de tirosina em antebraços de humanos com enfisema pulmonar (doença crônica que se caracteriza pela baixa tensão de oxigênio arterial) e demonstraram que o mecanismo predominante da atrofia muscular observada nesses pacientes é, assim como no rato, a redução na síntese protéica. Ao contrário dos processos de síntese, praticamente nada se sabe sobre o efeito da hipóxia na degradação de proteínas musculares.

As proteínas no músculo esquelético de mamíferos estão em contínua renovação, sendo a velocidade de síntese e degradação dessas moléculas precisamente reguladas

por diferentes fatores (LECKER et al., 2006). O músculo esquelético contém três principais sistemas proteolíticos: (a) o lisossomal que depende da atividade das catepsinas; (b) um sistema proteolítico no qual as proteases dependem de Ca^{+2} para serem ativadas (μ - e mili-calpaínas, que se diferenciam quanto à sensibilidade ao Ca^{+2}) e que possuem um inibidor endógeno conhecido como calpastatina e; (c) um sistema que é considerado de vital importância denominado de ubiquitina-proteassoma.

Embora grandes avanços tenham sido feitos na última década no conhecimento da estrutura molecular destes diferentes componentes proteolíticos, muito pouco se conhece sobre o papel de fatores hormonais, nutricionais e neurais que regulam as atividades destes sistemas proteolíticos em condições fisiológicas e patológicas. FAGAN & TISCHLER (1989) estudaram os efeitos da privação aguda de oxigênio em músculos *soleus* isolados de ratos e verificaram que a síntese foi abolida e a proteólise aumentada. Posteriormente, estes mesmos autores (FAGAN et al., 1992) demonstraram que a atividade proteolítica dependente de Ca^{+2} estava aumentada em músculos esqueléticos de aves depletados de ATP. Essas são as únicas evidências na literatura que mostram que as calpaínas têm um papel importante no aumento da proteólise em músculos esqueléticos de aves e roedores em condições hipóxicas *in vitro*.

Como discutido anteriormente, roedores expostos à HIC apresentam pressão arterial elevada, aumento da atividade simpática e das concentrações circulantes de catecolaminas (BRAGA et al., 2006). Embora esses animais não apresentem alterações das concentrações plasmáticas de glicose e insulina, há evidências de que a liberação de insulina pancreática em resposta à glicemia e o mecanismo de regulação

central da glicemia estão atenuados (VOLGIN & KUBIN, 2006). Foi também demonstrado que a hipóxia intermitente, independentemente da ativação simpática, causa resistência à insulina em camundongos e que esta resposta está associada à menor utilização de glicose pelas fibras musculares oxidativas (IIYORI et al., 2006). Todas essas alterações são bastante semelhantes ao que se observa em humanos com a síndrome da apnéia do sono, uma desordem caracterizada por hipertensão arterial e que geralmente está associada à obesidade e diabetes (PEPPARD et al., 2000). Por essa razão, esse modelo experimental torna-se bastante apropriado para investigar-se a fisiopatologia dessa doença, assim como estudar as possíveis correlações entre atividade simpática aumentada e alterações do metabolismo de proteínas.

Utilizando diferentes modelos de simpatectomia química (tratamento com guanetidina) e cirúrgica (adrenodemedulação e desnervação lombar), estudos anteriores de nosso laboratório demonstraram que o sistema nervoso simpático, mais precisamente a adrenalina plasmática, exerce um controle inibitório tônico da proteólise dependente de Ca^{+2} no sentido de preservar as proteínas musculares em ratos alimentados (NAVEGANTES et al., 2000-2004). De acordo com esta hipótese, a função anabólica das catecolaminas, em situações basais, é essencial para garantir a eficiência do processo contrátil, principalmente em músculos oxidativos como o *soleus*, onde a preservação da massa muscular é fundamental para a manutenção do tônus e postura do indivíduo. No entanto, nunca foi estudado o papel das catecolaminas no metabolismo de proteínas musculares em uma situação de hiperatividade simpática devido à HIC.

Considerando nossos dados anteriores que mostram que o SNS exerce um controle inibitório tônico sobre a proteólise muscular (NAVEGANTES et al., 2001-2002), nossa *hipótese* é que a hiperestimulação simpática induzida pela hipóxia, a longo prazo, possa resultar em efeitos anticatabólicos nas proteínas musculares.

2. Objetivos

1. Principal:

Verificar os efeitos da hipóxia intermitente crônica no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos oxidativos (soleus) e glicolíticos (EDL; extensor digitorum longus) de ratos.

2. Específicos:

Utilizando ratos (~3 semanas) submetidos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias, pretendeu-se:

1-Avaliar o ganho de massa corporal, massas de diferentes tecidos e possíveis alterações histológicas das fibras musculares esqueléticas.

2-Verificar as alterações nas concentrações plasmáticas das catecolaminas, no conteúdo de noradrenalina muscular, dopamina na glândula adrenal.

3-Determinar o perfil metabólico e hormonal dos animais hipóxicos por meio das medidas da concentração plasmática de glicose, lactato, ácido graxo livre, insulina, hormônios tireoidianos, corticosterona, conteúdo de ácidos graxos totais na carcaça e glicogênio hepático e muscular.

*4-Investigar as atividades das diferentes vias proteolíticas (lisossomal, dependente de Ca^{+2} e ubiquitina-proteassoma) e o processo de síntese total de proteínas musculares *in vitro*.*

5-Quantificar o conteúdo muscular dos diferentes componentes proteolíticos (calpaínas, calpastatina, subunidade C2 do proteassoma e conjugados poliubiquitinados).

6-Avaliar a oxidação de glicose e de ácido graxo em músculos incubados na presença ou não de insulina.

7-Determinar a atividade enzimática da citrato sintase e dos diferentes componentes da cadeia respiratória em músculos esqueléticos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 75 e 80g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)-USP. A razão da utilização de animais jovens foi devido à necessidade de se obter músculos isolados com pesos adequados à preparação *in vitro*. Nessas condições, os músculos mantêm as condições fisiológicas e bioquímicas ideais para o estudo do metabolismo intermediário (KETTELHUT et al., 1988). Os animais receberam dieta balanceada para roedores e água *ad libitum* em ambiente com ciclos claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada para 25⁰ C. Os animais foram sacrificados às 9:30h da manhã do décimo dia do experimento, ou seja, 16h após o último ciclo de hipóxia/normóxia. Um grupo separado de animais foi sacrificado às 17:30h, imediatamente após o último ciclo de hipóxia/normóxia para a mensuração do conteúdo protéico de calpastatina.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (número 157/2008).

3.2. Hipóxia intermitente crônica

Os animais foram divididos, inicialmente, em 2 grupos experimentais pesando em média 45g: o grupo hipóxico e o grupo controle. Os animais do grupo controle foram mantidos sobre condições normóxicas em câmaras similares àsquelas usadas pelos animais do grupo hipóxico. Os ratos foram colocados em gaiolas (máximo de 6 animais por gaiola) e mantidos dentro de câmaras Plexiglass (volume 210 l) equipadas

com injetores de gás assim como sensores para O_2 , CO_2 , umidade e temperatura. O protocolo de hipóxia, iniciada às 8h, consistiu em 5 min. de normóxia (concentração do oxigênio inspirado - FI_{O_2} - de 20,8%) seguidos de 4 min. de injeção de N_2 (100%) dentro da câmara para reduzir a FI_{O_2} de 20,8 para 6% (o que leva cerca de 200 s), permanecendo neste nível durante 40s. Após este período de hipóxia, O_2 (100%) foi injetado para retornar a FI_{O_2} para seu patamar original de 20,8%. Este ciclo de 9 min. foi repetido por 8 horas/dia (das 9.30 am até as 5.30 pm) durante 9 dias. Durante as 16 horas restantes os animais foram mantidos a uma FI_{O_2} de 20,8%. As injeções de N_2 e O_2 foram reguladas por um sistema de válvula solenóide, sendo a abertura e fechamento de cada um dos ejetores controlados por um sistema computadorizado (Oxycycler, Biospherix, Redfield, NY, USA). Nas outras câmaras, na mesma sala, o grupo controle foi exposto a FI_{O_2} de 20,8% por 24h/dia durante 9 dias. Tanto na câmara dos animais hipóxicos como na do controle, as injeções de gás foram feitas no nível mais alto da câmara para evitar que correntes de gás entrassem na gaiola no nível dos animais, desta forma evitando-se estresses desnecessários. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Benedito Honório Machado.

3.3. Massa corporal e ingestão alimentar

Para mensurar o ganho de massa corporal e a ingestão alimentar, os ratos foram pesados diariamente, tendo sido alojados, ao final de cada dia de ciclo, em gaiolas individuais cujos comedouros tinham sido pesados previamente. No dia seguinte,

sempre em um horário determinado, os comedouros eram novamente pesados e a diferença entre os pesos refletia o quanto havia sido ingerido, durante a noite, por cada animal.

3.4. Análise morfométrica dos músculos esqueléticos

Os fragmentos congelados de tecido muscular esquelético (*soleus*) foram seccionados em cortes transversais seqüenciais de 5 μ m de espessura utilizando um criostato. Os cortes histológicos foram visualizados em microscópio óptico Olympus IX 70 e as imagens captadas de todas as regiões do corte com uma câmera digital marca *Hopper Cientific* acoplada a um micro-computador. Para determinar o trofismo dos diferentes tipos de fibras musculares, as fibras dos tipos I, I/IIa, IIa/I e IIa e as fibras híbridas foram mensuradas para cada animal dos grupos hipóxia e controle.

Todas as fibras do campo, visualizadas inteiramente em seu diâmetro transversal, foram circundadas uma a uma, sendo medido o diâmetro mínimo através da função *Feret min* do *software* de análise de imagens *Image Pro Plus*, versão 4.1 para *Windows*. O *Feret min* consiste da menor distância, passando pelo centro do objeto, entre duas linhas paralelas onde todo o objeto esteja contido.

Estes experimentos foram realizados no Laboratório da Profa. Dra. Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira, no Departamento de Neurologia da FMRP-USP.

3.5. Concentrações de catecolaminas no plasma, adrenal e músculo esquelético.

A mensuração da atividade simpática foi realizada através das determinações das concentrações das catecolaminas no plasma, na glândula adrenal e nos músculos

soleus e EDL. As catecolaminas foram medidas através de método previamente padronizado em nosso laboratório (GAROFALO et al., 1996). As amostras foram analisadas usando-se HPLC (LC-7A, Shimadzu Instruments) com uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS-2 (5 μ m) (Sigma-Aldrich).

3.6. Proteólise em músculos isolados

Na manhã do experimento, os animais controles e hipóxicos foram pesados, escolhendo-se aqueles com pesos próximos a 75g. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical numa seqüência alternada entre os grupos, removendo-se rapidamente os músculos *Soleus* (*músculos oxidativo ou vermelho*) e EDL (*músculo glicolítico ou branco*). Em seguida, os músculos foram pesados em balança eletrônica digital, incubados em tampão Krebs Ringer Bicarbonato em condições apropriadas para a quantificação da proteólise. Para estes estudos utilizaram-se métodos desenvolvidos para a quantificação das diferentes vias proteolíticas em músculo esquelético de ratos jovens incubados *in vitro* (KETTELHUT et al., 1988).

Este método de quantificação da atividade proteolítica utiliza músculos íntegros, retirados rapidamente do animal e fixados por meio dos seus tendões a suportes de alumínio para o *soleus* e de acrílico para o EDL, mantendo-se assim os seus comprimentos de repouso, sendo os mesmos posteriormente incubados em tampão apropriado. A manutenção dos músculos nestas condições possibilita a difusão de oxigênio e nutrientes, evitando-se a anóxia das fibras musculares centrais. Desta forma, a proteólise muscular é reduzida, há manutenção dos conteúdos de ATP, de fosfocreatina e glicogênio no tecido muscular, reproduzindo as características dos

músculos em crescimento *in vivo*. Nestas condições, os músculos podem ser mantidos *in vitro* por até 8h em boas condições morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (KETTELHUT et al., 1994).

3.6.1. Atividades proteolíticas

A determinação da atividade proteolítica foi estimada por meio da liberação de tirosina de proteínas de músculos incubados na presença de cicloheximida, a qual impede a reutilização dos aminoácidos para a síntese de proteínas. A tirosina é um aminoácido normalmente escolhido para avaliação da proteólise por não ser catabolizado e nem sintetizado "de novo" pelo músculo. Além disso, é facilmente dosado através 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 proteínas celulares.

As vias proteolíticas estudadas em músculos esqueléticos *soleus* e EDL foram a lisossomal, a via dependente de Ca^{+2} , a dependente de ubiquitina-proteassoma e a via residual, seguindo os protocolos metodológicos descritos a seguir. A participação das vias correspondeu à diferença da liberação de tirosina no meio de incubação entre os músculos das patas (direita e esquerda), incubados na presença ou ausência de inibidores específicos. A estimativa da *Via lisossomal* foi baseada na redução da proteólise causada pela adição de bloqueadores da função proteolítica lisossomal (metilamina e aminoácidos de cadeia ramificada). A participação da *Via Ca^{+2} -dependente* foi avaliada a partir da comparação de patas incubadas na ausência ou na

presença de inibidores das calpaínas (E64 e leupeptina), em meio livre de cálcio. A *Via dependente de ubiquitina-proteassoma* foi quantificada, após bloqueio das vias lisossomal e Ca^{+2} -dependente, em condições de incubação onde em uma das patas a atividade do proteassoma será inibida pela adição do MG-132. A atividade da *Via "residual"* corresponderá à proteólise remanescente, quando todas as 3 vias restantes estiverem bloqueadas.

3.7. Conteúdo protéico dos componentes do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} .

3.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

Os músculos esqueléticos de ratos dos diferentes grupos experimentais foram homogeneizados no Politrom, em 6 volumes de tampão A (50 mM de Tris pH 7,4, 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio, 1% SDS, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina e 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina).

O homogenado foi centrifugado a 15000 rpm, 4°C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para quantificação de proteína pelo método de LOWRY et al. (1951) e posteriormente para identificação do conteúdo protéico de diversas proteínas. À amostra de sobrenadante foi adicionada tampão da amostra [solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 4%, 125 mM de Tris-HCl, glicerol 20%, 100 mM de DTT, azul de bromofenol 2% e pH 6,8 ajustado com 1M de HCl].

A eletroforese em gel de SDS-PAGE foi realizada de acordo com o método descrito por LAEMMLI (1970). As amostras foram aquecidas a 100°C por 4 minutos

e aplicadas em sistema de mini-gel vertical (modelo Protean III e IV Cell BioRad, Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) de acrilamida:bisacrilamida com 0,75 mm de espessura, gel de separação variando de 8 a 16%. Na lateral foi aplicado padrão de massa molecular da Fermentas (10-170 kDa). As corridas eletroforéticas foram realizadas em cubas de acrílico contendo tampão de corrida (25mM de Tris-HCl pH 8,4, 115mM de glicina, SDS 0,1%), sob voltagem de 100 Volts, durante 3 a 4 horas.

3.7.2. *Western blot*

Após a corrida eletroforética, o gel foi preparado para a transferência (BioRad Trans-Blot SD Cell, EUA) de acordo com o método descrito por TOWBIN et al. (1979). Inicialmente, o gel e a membrana de nitrocelulose foram colocados na solução de transferência (48mM de Tris, 39mM de glicina, SDS 10% e 0,2M de metanol). Após a montagem do sistema de transferência, as proteínas presentes no gel de poli-acrilamida foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (NC), sendo o processo de transferência realizado durante 30 minutos sob a voltagem fixa de 20 volts, à temperatura ambiente. Após o término da transferência, a membrana de NC foi submetida à *immunoblot*, sendo incubada por 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente com leite desnatado em pó 10%, diluído em TBS-T (0,02 M de Tris-HCl, 0,16M de NaCl e 0,1% Tween 20). Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* (aproximadamente 12 horas) a 4°C com anticorpos primários para detecção da m-calpaína (1:750; anticorpo de coelho anti-m-calpaína – Cell Signaling, EUA), da μ -calpaína (1:750; anticorpo de cabra anti- μ -calpaína – Santa Cruz, EUA), da calpastatina (1:50; anticorpo de cabra anti-calpastatina – Santa Cruz, EUA), da

subunidade C2 do proteassoma (1:750; anticorpo de coelho anti-subunidade C2 – BostonBiochem, EUA), da β -actina (1:3000; anticorpo de camundongo anti- β -actina – Santa Cruz, EUA) e da dineína (1/500). Os anticorpos foram então retirados e a membrana devidamente lavada com solução de TBS-T, posteriormente incubada durante 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase (anti-IgG de cabra, diluição de 1:5.000 em TBS-T para a μ -calpaína e calpastatina; anti-IgG de camundongo, diluição de 1:5.000 em TBS-T para a β -actina; e anti-IgG de coelho, diluição de 1:7.500 em TBS-T para m-calpaína e 1:5.000 para as demais proteínas). Após lavagem das membranas para remoção do excesso de anticorpo secundário não ligado, a membrana foi revelada com filme autoradiográfico (Hyperfilm ECL, Amersham), na ausência de luz, variando entre 2 minutos e 1 hora após a adição de partes iguais dos reagentes do Kit de Quimioluminescência Amplificada (ECL, Amersham).

Os conteúdos relativos de m-calpaína e calpastatina foram corrigidos pela β -actina e a μ -calpaína pela dineína. Posteriormente, as bandas foram fotografadas e quantificadas usando-se o *software* LabImage (*Version 2.7.1 – National Institutes of Health, EUA*).

3.8. Síntese total de proteínas musculares

Os músculos *soleus* e EDL foram incubados com seus tendões fixos a suportes apropriados para manutenção dos seus comprimentos de repouso, em tampão Krebs Ringer Bicarbonato, contendo glicose e todos os vinte aminoácidos, em concentrações semelhantes às encontradas no plasma de ratos. Para a avaliação da

incorporação de aminoácidos marcados em proteínas musculares foi utilizado [U-¹⁴C]-Tirosina (0,1 mM, 0,05 µCi/ml).

Após o período de incubação, os músculos foram homogeneizados com ácido tricloroacético (TCA) 5%, centrifugados e o precipitado lavado 3 vezes com 1 ml de TCA 5%. A dissolução do precipitado final foi obtida pela adição de 1 ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% em banho maria a 40°C por 2 horas. A seguir, foram acrescentados 4 ml de líquido de cintilação biodegradável e a leitura feita em espectrofotômetro de cintilação líquida (TRI-CARB 2100TR, Packard BioScience Company).

Os cálculos para a determinação da síntese de proteínas utilizaram a atividade específica intracelular de cada músculo. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Controle do Metabolismo do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP que possui licença do CNEM para o uso de radioisótopos.

3.9. Oxidação de glicose e palmitato

Os músculos *soleus* e EDL foram incubados por 2 horas a 37°C em meio contendo tampão Krebs-Ringer bicarbonato e [1-¹⁴C]-glicose (0,5 µCi/mL) ou [1-¹⁴C]-ácido palmítico (3 µCi/mL), em frascos 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 foi adicionado 0,25 mL de hiamina (para captar o CO₂ liberado pelo músculo no meio de incubação). Para a solubilização do ácido palmítico no meio de incubação e sua utilização adequada pelo tecido muscular, procedeu-se à formação de palmitato de sódio: preparou-se o etilato de sódio, dissolvendo uma porção de cerca de

500mg de sódio metálico sem impurezas em 20ml de etanol absoluto. Enquanto ocorria essa dissolução o ácido palmítico foi pesado em quantidades adequadas para a obtenção das diferentes concentrações (0,3 a 2,0mM), o qual foi dissolvido em éter etílico. Foi adicionada 1 gota de fenolftaleína (como indicador de pH) a essa solução, que, em seguida foi titulada com o etilato de sódio até que ficasse 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 foi evaporado com gás nitrogênio. O palmitato de sódio formado foi então dissolvido em NaCl 0,12M sob aquecimento e agitação, contendo 1% ou 2% de albumina, dependendo da concentração de ácido palmítico utilizada. Foi nesta fase que ocorreu a ligação das moléculas de palmitato aos sítios da albumina. A solução de palmitato de sódio ligado à albumina foi 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*.

Músculos *soleus* e EDL de animais controles e hipóxicos foram incubados na presença ou não de insulina (50 mU). Após a incubação, foi injetado ácido sulfúrico 6N (0,25 mL) pela rolha de borracha no compartimento principal do frasco, a fim de reduzir o pH, interromper as reações tissulares e favorecer a captação de CO₂ produzido. Após este procedimento, foi aguardado um tempo de 1 a 2 horas para que todo o CO₂ 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 4 mL de coquetel de cintilação biodegradável para contagem da radioatividade

incorporada em CO₂ em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB 2100TR, Packard BioScience Company). Os valores de oxidações finais tanto de glicose quanto de palmitato foram expressos por mg de tecido muscular.

3.10. Atividades enzimáticas da citrato sintase e dos complexos da cadeia respiratória

As atividades da citrato sintase e dos complexos da cadeia respiratória I, II, III e IV foram mensuradas no homogenado de músculos *soleus*. Os homogenados foram preparados a partir de tecidos congelados pesando de 20 a 40 mg. Os fragmentos foram homogenizados a 10% (peso/volume) em um tampão 50 mM Tris-HCl e 150 mM KCl, pH 7.5. Todos os ensaios foram feitos com um volume final de 1 ml a 30° C, usando um espectrofotômetro Beckman-Coulter DU-640, como previamente descrito (DIMAURO et al., 1987; BIRCHMACHIN et al., 1994; SRERE, 1969). As atividades foram calculadas em nmoles/min/mg de proteína e corrigidas em relação à atividade da citrato sintase.

3.10.1. Citrato sintase

A atividade da enzima citrato sintase foi quantificada em meio contendo 100 mM de Tris-HCl no pH 8,1, 0,1 mM de 5-5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) – DTNB e 0,3 mM de acetil CoA, ao qual foi adicionado parte do sobrenadante do homogeneizado. A atividade foi monitorada pela alteração da absorvância no comprimento de onda de 412 nm, após a adição de 0,5 mM de oxaloacetato (SRERE, 1969).

3.10.2. *Complexo I da cadeia respiratória (NADH ubiquinona oxido-redutase)*

O ensaio foi realizado com leitura no comprimento de onda de 340 nm, sendo observada a diminuição na absorvância resultante da oxidação da NADH. A reação foi realizada em meio contendo 25 mM de tampão de fosfato de potássio no pH 7,5, 5 mM de cloreto de magnésio, 130 μ M de NADH como agente doador, 65 μ M de coenzima Q1, 200 μ M de cianeto de potássio (KCN) e 2 μ g/ml de antimicina A, suplementado com 2,5 mg/ml de albumina sérica bovina. O início da reação se dá após adição de parte do sobrenadante do homogeneizado. A absorvância foi medida durante 2 minutos e então inibida pela adição de 2 μ g/ml de rotenona (BIRCHMACHIN et al., 1994).

3.10.3. *Complexo II da cadeia respiratória (succinato ubiquinona oxido-redutase)*

O ensaio foi realizado com leitura no comprimento de onda de 600 nm, medindo-se a variação da absorvância resultante da redução do 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP). A reação foi realizada em meio contendo 50 mM de tampão de fosfato de potássio no pH 7,0, 0,003% de DCPIP como acceptor, 16 mM de succinato como doador e 1,5 mM de cianeto de potássio. O início da reação se dá a partir da adição de parte do sobrenadante do homogeneizado, sendo observado o decaimento na absorvância durante 1 minuto (DIMAURO et al., 1987).

3.10.4. Complexo III da cadeia respiratória (ubiquinol citocromo c oxido-redutase)

O ensaio foi realizado com leitura no comprimento de onda de 550 nm, observando a variação da absorvância resultante da redução do citocromo *c*. A reação foi realizada em meio contendo 25 mM de tampão de fosfato de potássio no pH 7,2, 5 mM de cloreto de magnésio, 15 mM de citocromo *c*, 2 mM de cianeto de potássio e 2 µg/ml de rotenona, suplementado com 2,5 mg/ml de albumina sérica bovina. Parte do sobrenadante do homogeneizado foi adicionada e, após alguns minutos, a reação foi iniciada com a adição de 35 µM de ubiquinol, sendo observado o incremento da absorvância durante 2 minutos (BIRCHMACHIN et al., 1994).

3.10.5. Complexo IV da cadeia respiratória (citocromo c oxidase)

O ensaio foi realizado com leitura no comprimento de onda de 550 nm, observando a variação da absorvância resultante da oxidação do citocromo *c* reduzido. A reação foi realizada em meio contendo 1 mM de fosfato de potássio no pH 7,0 e 0,1 % de citocromo *c* reduzido. A redução do citocromo *c* foi induzida pelo hidrossulfito de sódio a 5%. O início da reação se dá após a adição de parte do sobrenadando do homogeneizado, sendo observado o decaimento da absorvância durante 4 minutos (DIMAURO et al., 1987).

Estes experimentos foram realizados no Laboratório da Profa. Dra. Cláudia Ferreria da Rosa Sobreira do Departamento de Neurologia da FMRP-USP.

3.11. Análises bioquímicas

O sangue foi coletado em tubos heparinizados, após decapitação dos animais. Em seguida, o sangue foi centrifugado para obtenção do plasma. As concentrações plasmáticas de glicose e lactato foram determinadas enzimaticamente em um analisador bioquímico (YSI 2700-D, Yellow Springs, OH, USA). As dosagens plasmáticas de insulina, corticosterona e T4 foram realizadas através de ensaio radioimunológico de fase sólida, utilizando-se “kit” comercial (DPC-MEDLAB). A concentração de proteínas foi mensurada pelo método mini Lowry (LOWRY et al., 1951). O conteúdo total de ácidos graxos na carcaça foi obtido pelo método gravimétrico. As concentrações de ácidos graxos livres foram determinadas por espectrofotometria modificada para leitura em placas de ELISA, utilizando o kit NEFA (Randox, UK) para ensaio em soro.

3.12. Glicogênio hepático e muscular

As determinações do conteúdo de glicogênio foram realizadas a partir de amostras de tecido hepático (500mg) e de músculos *soleus* e EDL colhidas imediatamente após o sacrifício dos animais. O tecido pesado foi colocado em tubos de centrífuga contendo 2 ml de KOH 30%. A extração foi realizada através do método de SJÖRGREN et al.(1938) e a quantificação do glicogênio hepático e muscular foi realizado pelo método de antrona segundo CARROL et al. (1956).

3.13. Análise estatística

Os resultados foram expressos como Médias \pm EPM (Erro Padrão da Média). Para a análise estatística dos resultados entre os grupos controles e experimentais empregaram-se análise de variância (ANOVA) *oneway* ou o teste-t. Para a caracterização do padrão de distribuição dos valores de diâmetro mínimo das fibras musculares foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov e, em seguida, o teste de Mann-Whitney. Para a análise estatística das atividades enzimáticas da citrato sintase e dos complexos da cadeia respiratória foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O nível de significância utilizado foi de 5%.

4. Resultados

4.1. Ganho de massa corporal, ingestão alimentar, massa dos tecidos e morfometria da musculatura esquelética.

A Figura 1 apresenta o ganho de massa corporal dos animais dos grupos experimental e controle, pesados diariamente, ao longo de 9 dias de exposição à hipóxia e normóxia, respectivamente. Os valores médios da massa corporal dos animais hipóxicos, nos 5 primeiros dias de exposição à HIC, não foram alterados. Porém, a partir do 7º dia, verificou-se que os animais hipóxicos ganharam menor massa corporal (~8%) quando comparados aos seus controles.

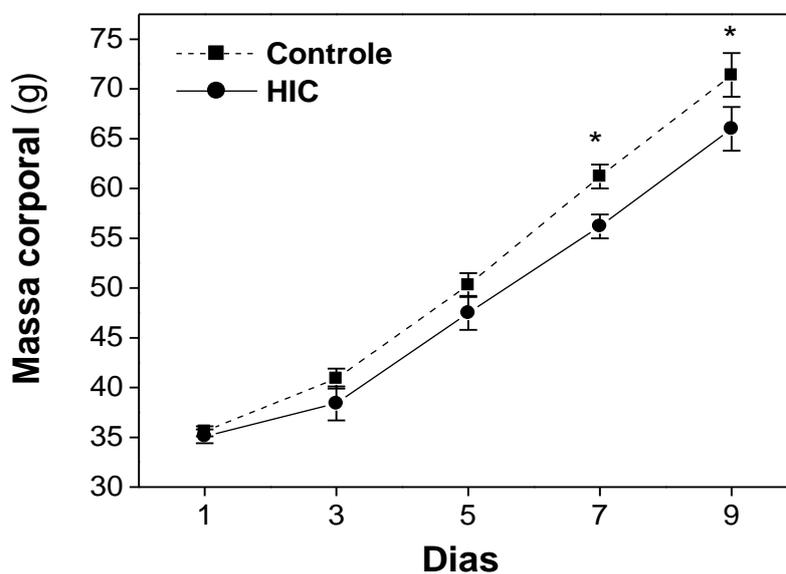


Figura 1. Massa corporal de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias. Os valores são expressos como Média \pm EPM (n=10). * $P \leq 0.05$ em relação ao grupo controle.

A Figura 2 apresenta os valores de consumo alimentar, corrigidos por 100g de massa corporal (MC), de animais hipóxicos e controles. Pode-se observar que não houve diferença significativa na ingestão de alimentos entre os grupos, durante todo o período experimental. Estudos anteriores realizados no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia mostraram que a HIC também não altera a ingestão hídrica e nem o volume urinário dos animais (dados não apresentados).

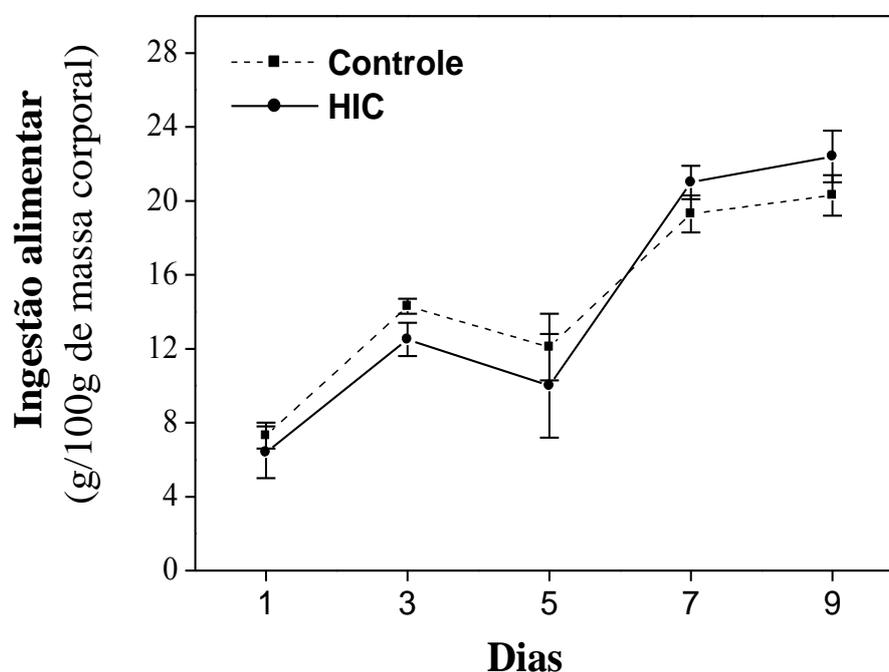


Figura 2. Ingestão alimentar de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias. Os valores são expressos como Média \pm EPM (n=10).

A redução do ganho de massa dos animais hipóxicos não foi relacionada às alterações da massa gorda dos animais, uma vez que não houve diferença entre a massa (mg/100g MC) dos tecidos adiposos (epidimal [Controle: 136 ± 17 vs. HIC: 121 ± 10 ; n=10] e retroperitoneal [Controle: 143 ± 16 vs. HIC: 133 ± 16 ; n=9]) e nem do conteúdo de ácidos graxos de carcaça (Controle: 3.6 ± 0.2 vs. HIC: 3.5 ± 0.1 g%; n=8) entre os grupos estudados.

Em relação à massa muscular, a HIC aumentou a massa cardíaca (Figura 3) e reduziu, significativamente, a massa (Figura 4A) dos músculos *soleus* e EDL (19%), tibial anterior (18%) e gastrocnêmio (17%). Esta redução foi em torno de 10% quando as massas dos músculos (*soleus*, *EDL* e tibial anterior) foram corrigidas por 100g de MC (Figura 4B). A Figura 4 (C e D) mostra a análise histológica dos diferentes tipos de fibras (I, I/IIa, IIa/I e IIa) em músculos *soleus* de animais controles e hipóxicos. Observa-se que a HIC reduziu o diâmetro médio mínimo (Figura 4C) das fibras musculares intermediárias do tipo IIa/I (8%) e IIa (10%), as quais sabidamente possuem um perfil mais glicolítico dentre as diferentes fibras existente nos músculos tipicamente oxidativos como o *soleus*. O número total médio de fibras analisadas não foi significativamente diferente entre os grupos (Controle: 263 ± 14 vs. HIC: 302 ± 10 ; n=5). Também não houve diferenças entre as proporções dos diferentes tipos de fibras entre os grupos (Figura 4D), o que, aparentemente, demonstra que a condição hipóxica não induziu interconversão das mesmas. Estes dados indicam que a perda de massa corporal dos animais submetidos à HIC foi decorrente da redução da massa muscular esquelética.

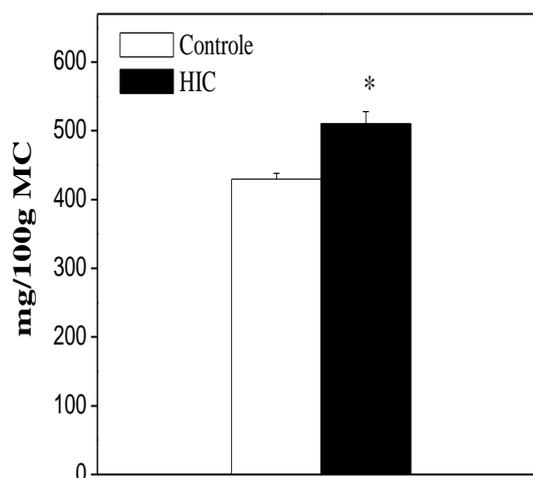


Figura 3. Massa cardíaca de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC) durante 9 dias. Os valores são expressos como Média \pm EP (n=9) *. $P \leq 0.05$.

4.2. Concentrações plasmáticas e teciduais de catecolaminas

Sabendo-se que a hipóxia é um poderoso estímulo da atividade simpática periférica, foram determinadas nesse estudo as concentrações plasmáticas e teciduais das catecolaminas em animais controles e expostos à HIC. Observa-se na Figura 5A que tanto as concentrações plasmáticas de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) como o conteúdo de noradrenalina em músculos *soleus* (Figura 5B) não foram alterados pela HIC. Porém, houve um aumento acentuado (~75%) no conteúdo de dopamina na glândula adrenal (Figura 5C) dos ratos hipóxicos em relação aos controles, indicando um aumento da velocidade de síntese das catecolaminas pelas células cromafins da medula adrenal (MUELLER et al., 1969).

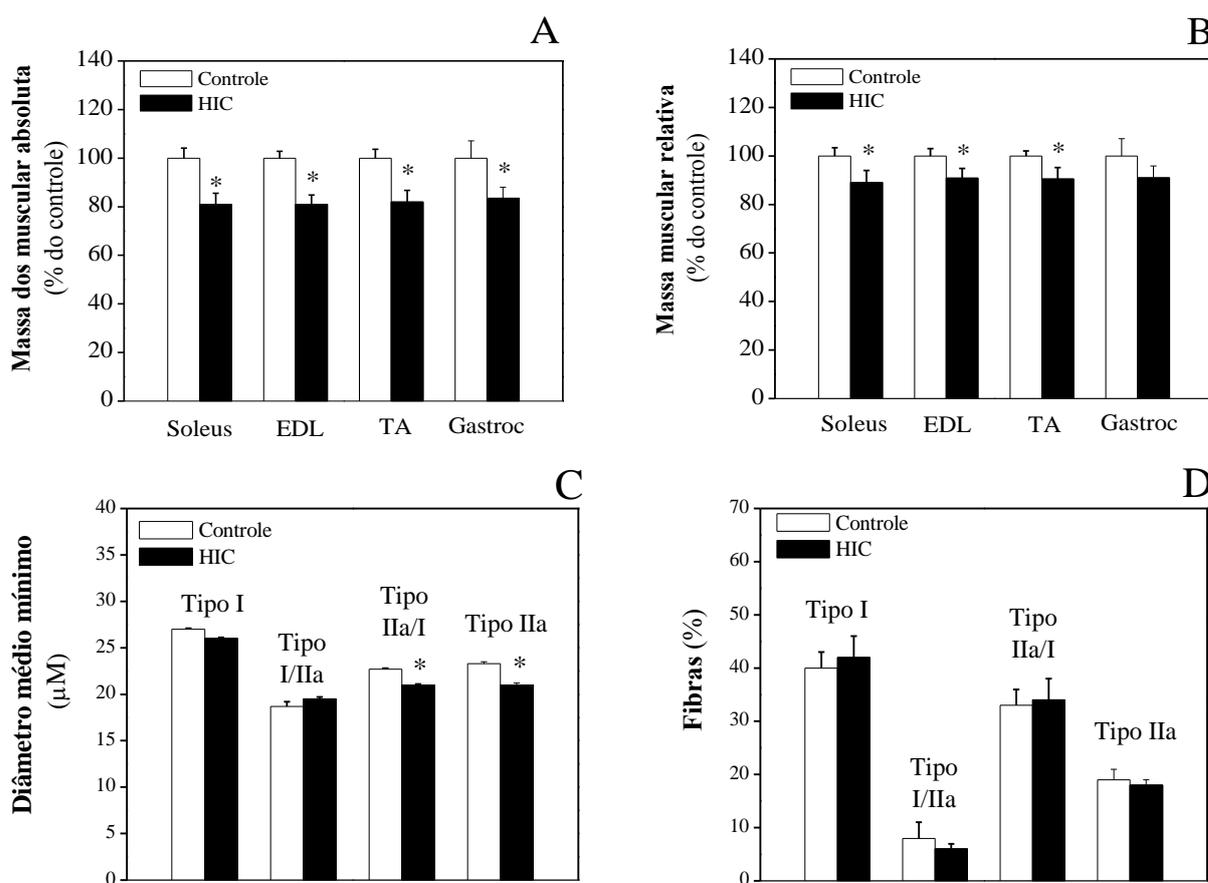


Figura 4. Massa dos músculos esqueléticos expressa em termos absolutos (A) e relativos (B), Diâmetro médio mínimo (C) e Distribuição percentual (D) dos diferentes tipos de fibras em músculo *soleus* de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias. Os valores são expressos como Média \pm EPM (n=10). Os valores médios \pm EPM das massas absolutas (mg) e relativas (mg/100g MC) dos músculos controles foram, respectivamente: *Soleus* (34 ± 1 e 46 ± 2); *EDL* (25 ± 1 e 34 ± 1); *TA* (101 ± 4 e 140 ± 3); *Gastroc* (430 ± 31 e 597 ± 42). *TA*: Tibial Anterior; *Gastroc*: Gastrocnêmio.

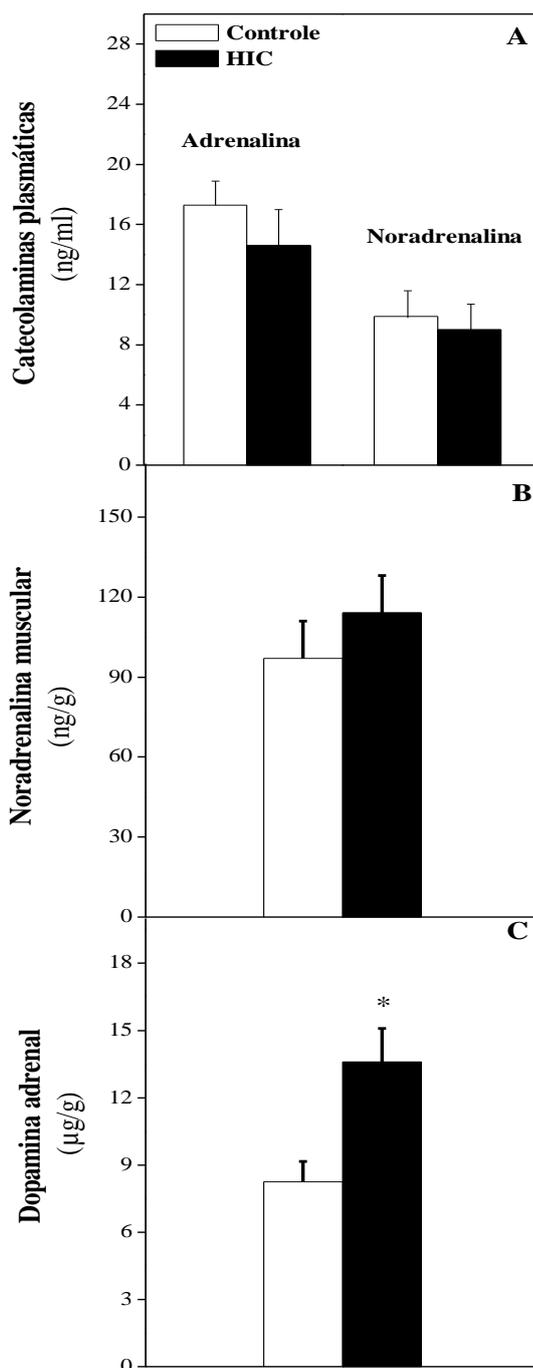


Figura 5. Concentrações das catecolaminas no plasma (A) e conteúdo de noradrenalina no músculo *Soleus* (B) e de dopamina na glândula adrenal (C) de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias. Os valores são expressos como Média \pm EP (n=7). * $P \leq 0.05$.

4.3. Parâmetros metabólicos e hormonais

Para a caracterização de nosso modelo experimental e avaliação de possíveis alterações metabólicas e hormonais induzidas pela HIC, vários parâmetros foram determinados após os 9 dias de exposição. A Tabela 1 mostra que as concentrações plasmáticas de glicose, lactato e insulina não se alteraram; já os ácidos graxos livres (AGL) plasmáticos mostraram uma redução significativa de 29% nos animais hipóxicos em relação aos animais controles. Os hormônios corticosterona e tiroxina (T_4) também foram mensurados e não apresentaram alterações significativas entre ratos hipóxicos e controles.

O conteúdo de glicogênio hepático (Figura 6A) e de glicogênio do músculo *soleus* apenas (Figura 6B) de ratos hipóxicos foi significativamente maior (~70%) do que seus controles. O conteúdo de glicogênio em músculos EDL não foi diferente entre os grupos experimentais (Controle: $0,83 \pm 0,05$ vs. HIC: $0,83 \pm 0,03$; n=8).

Tabela 1. Parâmetros metabólicos e hormonais em ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias.

	AGL (nmol/l)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Insulina (μ U/ml)	Corticoesterona (μ g/dl)	T4 (μ g/dl)
Controle	0.49 ± 0.04	7.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	9.2 ± 0.9	6.4 ± 1.6	5.1 ± 0.2
HIC	$0.35 \pm 0.02^*$	7.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	7.5 ± 0.7	6.5 ± 1.1	5.2 ± 0.2

Os valores são expressos como Média \pm EPM (n=8-9). . * $P \leq 0.05$ em relação ao grupo controle. AGL: ácidos graxos livres, T4: tiroxina.

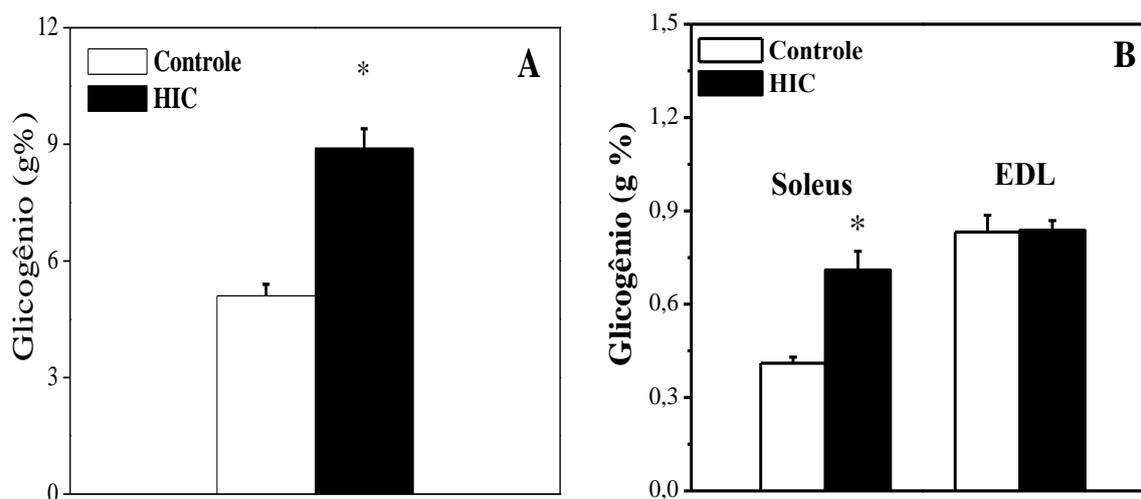


Figura 6. Conteúdo de glicogênio hepático (A) e de glicogênio muscular (B) de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias. Os valores são expressos como Média \pm EP (n=8-9) * $P \leq 0.05$.

4.4. Velocidade de síntese e degradação total de proteínas musculares.

A Figura 7 apresenta os efeitos da HIC nos processos de síntese e degradação de proteínas em músculos *soleus* e EDL *in vitro*. O efeito da HIC na velocidade de síntese protéica foi avaliado por meio da incorporação de tirosina marcada ($U-^{14}C$) em proteínas totais dos músculos. Como demonstrado na Figura 7A, houve uma diminuição significativa (~25%) na síntese protéica tanto em *soleus* como em EDL de ratos hipóxicos, em relação a seus controles. Os resultados apresentados na Figura 7B mostram os valores da proteólise total, estimada por meio da liberação de tirosina, em músculos isolados de animais hipóxicos e controles. Pode-se verificar que músculos *soleus* de animais submetidos à HIC apresentaram uma redução significativa de 17% de sua atividade proteolítica quando comparados a animais controles. Já a atividade proteolítica em músculos EDL não foi alterada pela hipóxia.

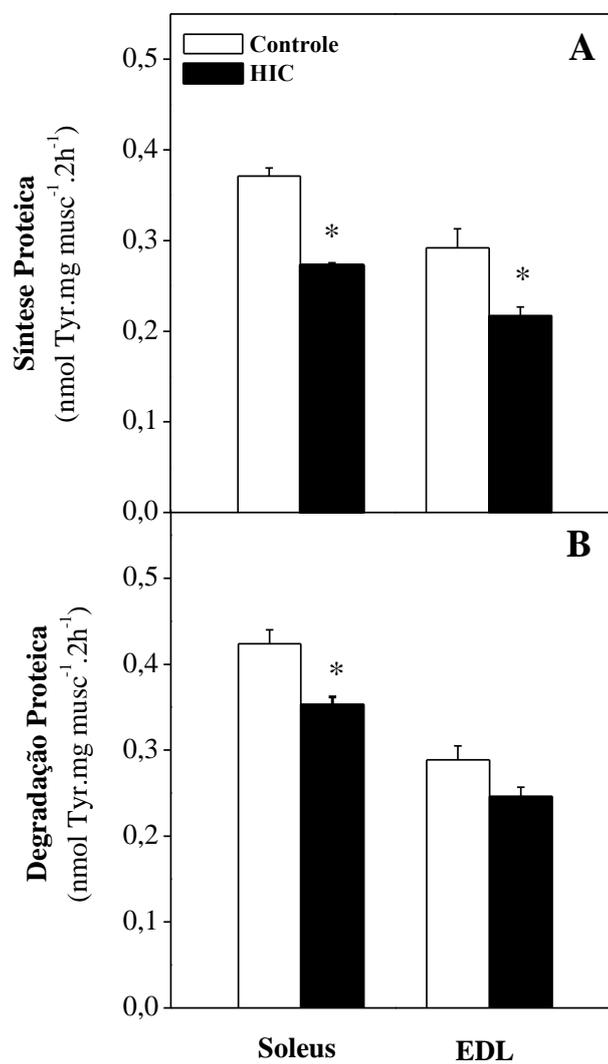


Figura 7. Síntese (A) e degradação proteica (B) em músculos *soleus* e EDL de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias. Os valores expressos são como Média \pm EP (n=7) * $P \leq 0.05$.

4.5. Atividades dos sistemas proteolíticos em músculos esqueléticos.

Inicialmente, foi verificado o efeito da HIC nas atividades das vias proteolíticas: lisossomal, dependente de Ca^{+2} e ubiquitina-proteassoma, em músculos *soleus* e EDL. As atividades das vias proteolíticas nos músculos de ratos hipóxicos variaram de acordo com o tipo de músculo estudado. A redução da degradação total de proteínas observada em músculos *soleus* de ratos hipóxicos foi acompanhada por uma diminuição de 50% na atividade proteolítica dependente de Ca^{+2} (Figura 8A), sem qualquer alteração nas atividades dos demais sistemas proteolíticos. As atividades da via dependente de Ca^{+2} , ubiquitina-proteassoma e lisossomal não foram alteradas em músculos EDL de ratos expostos ao mesmo ciclo de hipóxia (Figura 8B).

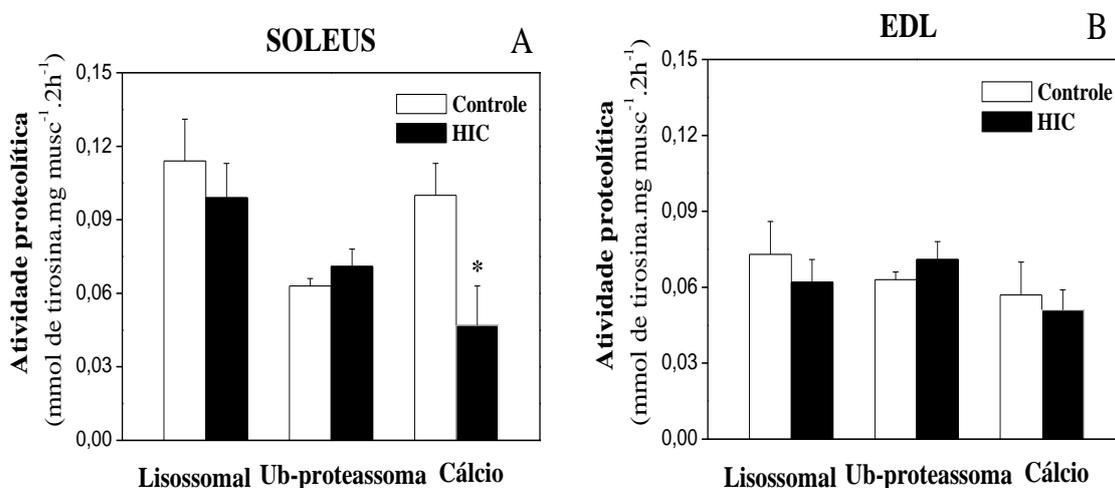


Figura 8. Atividade das diferentes vias proteolíticas em músculos *soleus* e EDL de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias. Os valores expressos são como Média \pm EP (n=8) * $P \leq 0.05$. Ub: Ubiquitina.

4.6. Conteúdo protéico dos componentes da via Ca^{+2} -dependente em músculos *soleus*.

Tendo em vista a menor atividade da via Ca^{+2} -dependente observada em músculo *soleus* de ratos hipóxicos, procedeu-se a investigação do conteúdo protéico dos componentes implicados nesta via: as proteases (μ - e m-calpaína) e o seu inibidor endógeno, a calpastatina.

A Figura 9 mostra os conteúdos protéicos das formas autolisada (ativa) e não autolisada (inativa) das μ -calpaínas em músculos *soleus* de ratos controles e hipóxicos. Não há diferença entre a expressão das formas autolisada e não autolisada da μ -calpaína em músculos *soleus* de animais controles. No entanto, em músculos de animais hipóxicos, a forma predominante é a autolisada. O aumento do conteúdo da μ -calpaína em sua forma autolisada nos músculos dos animais hipóxicos foi de ~60% em relação aos controles indicando que a HIC aumentou a forma ativa desta enzima proteolítica. Como se pode verificar, também na Figura 9, o conteúdo total (estimado pela somatória das análises densitométricas da protease em suas duas formas) da μ -calpaína não mostrou alteração entre os grupos hipóxicos e controles. Também não se observou diferença significativa entre o conteúdo protéico da m-calpaína em músculos *soleus* de animais controles e hipóxicos (Figura 10).

A Figura 11A mostra que o conteúdo de calpastatina dos ratos submetidos à HIC aumentou 50% em relação aos controles. Resultados semelhantes a estes foram observados em um grupo separado de animais sacrificados imediatamente após o último ciclo da hipóxia, ou seja, às 17h do dia 9 (Figura 11B).

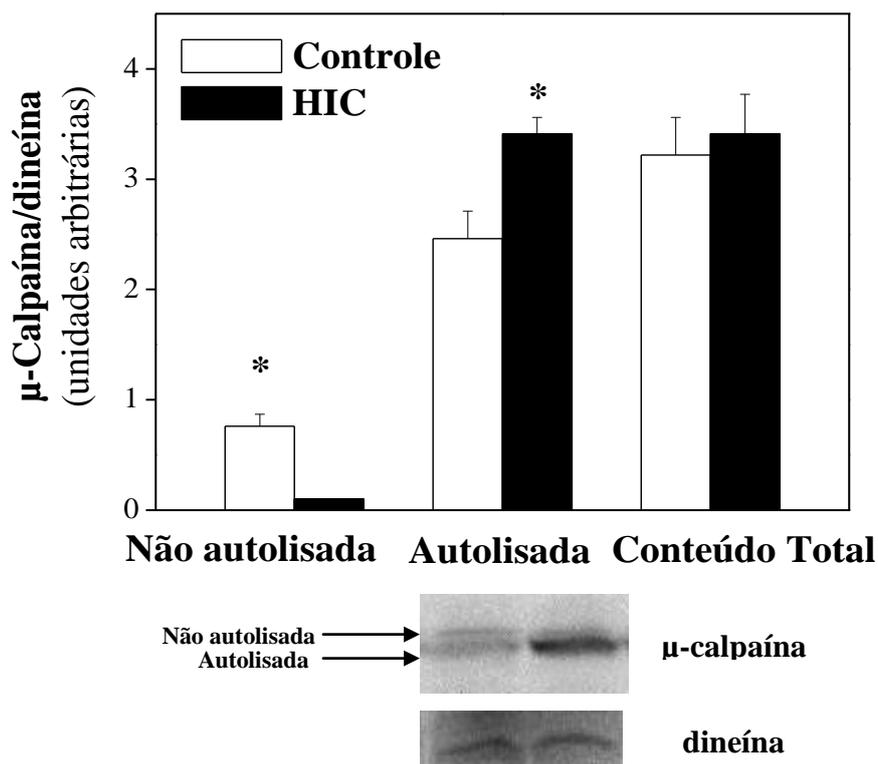


Figura 9. Conteúdo protéico de μ -calpaína não autolisada (80 kDa) e autolisada (75 kDa) corrigidos por dineína em músculo *soleus* de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias. Os valores são expressos como Média \pm EP (n=7). * $P \leq 0.05$.

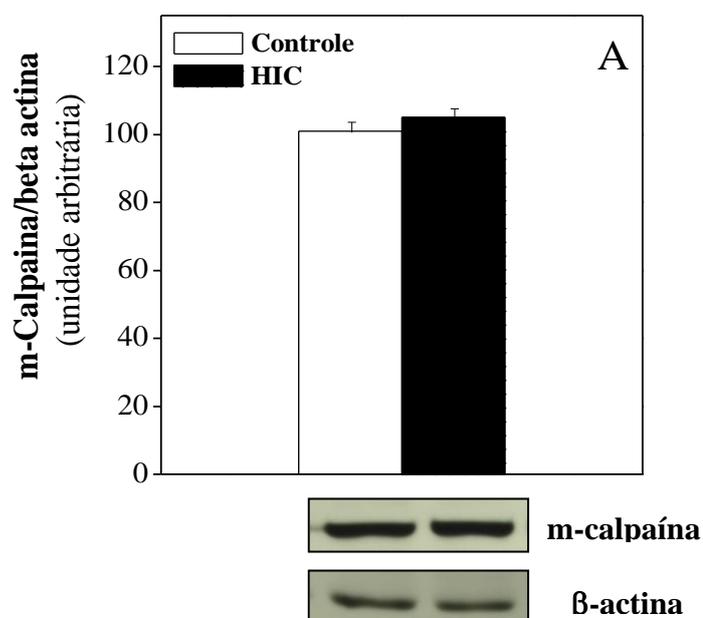


Figura 10. Conteúdo protéico de m-calpaína (80 kDa) corrigidos por β -actina em músculo *soleus* de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias. Os valores são expressos como Média \pm EP (n=7).

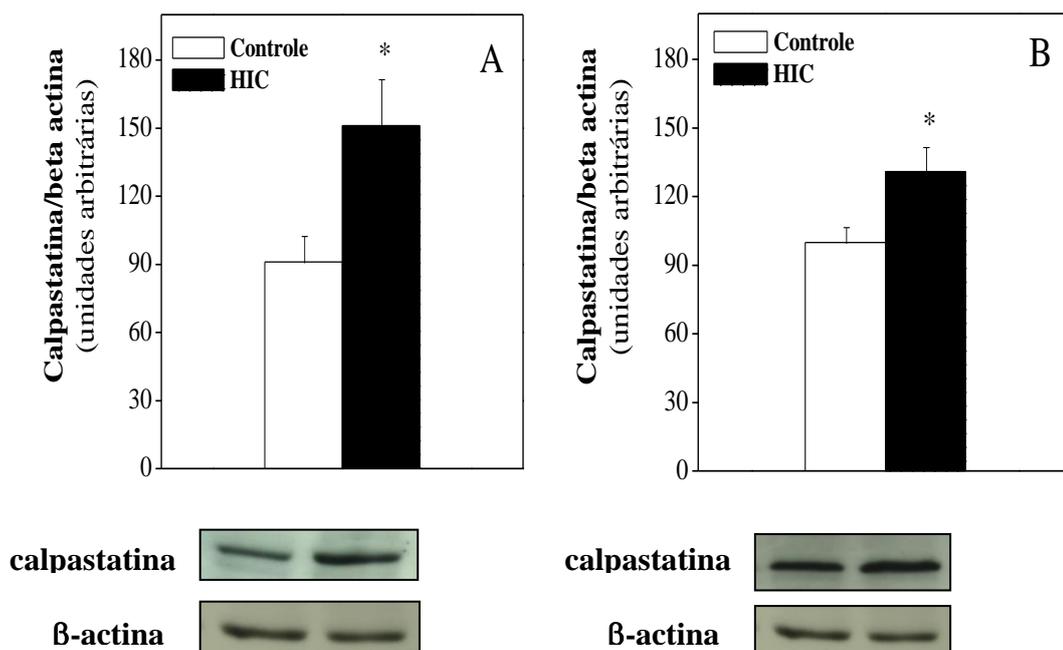


Figura 11. Conteúdo protéico calpastatina (129 kDa) corrigidos por β -actina em músculo *soleus* de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias. *A*: os animais foram sacrificados na manhã seguinte à última exposição hipóxica. *B*: os animais foram sacrificados imediatamente após o último evento hipóxico. Os valores são expressos como Média \pm EP (n=7). * $P \leq 0.05$.

4.7. Conteúdo protéico dos conjugados poli-ubiquitinados e da subunidade C2 do proteassoma em músculos EDL.

Como os valores da proteólise dependente de ubiquitina-proteassoma em músculo EDL de ratos submetidos à HIC mostraram uma tendência à diminuição em relação aos controles, quantificou-se o conteúdo dos conjugados de poli-ubiquitina e da subunidade C2 do proteassoma nestes músculos. Como pode ser verificado na Figura 12, a HIC não induziu alterações significativas em nenhum desses parâmetros, confirmando então os achados de que a atividade da via proteolítica dependente de ubiquitina-proteassoma em músculos EDL não é afetada pela hipóxia.

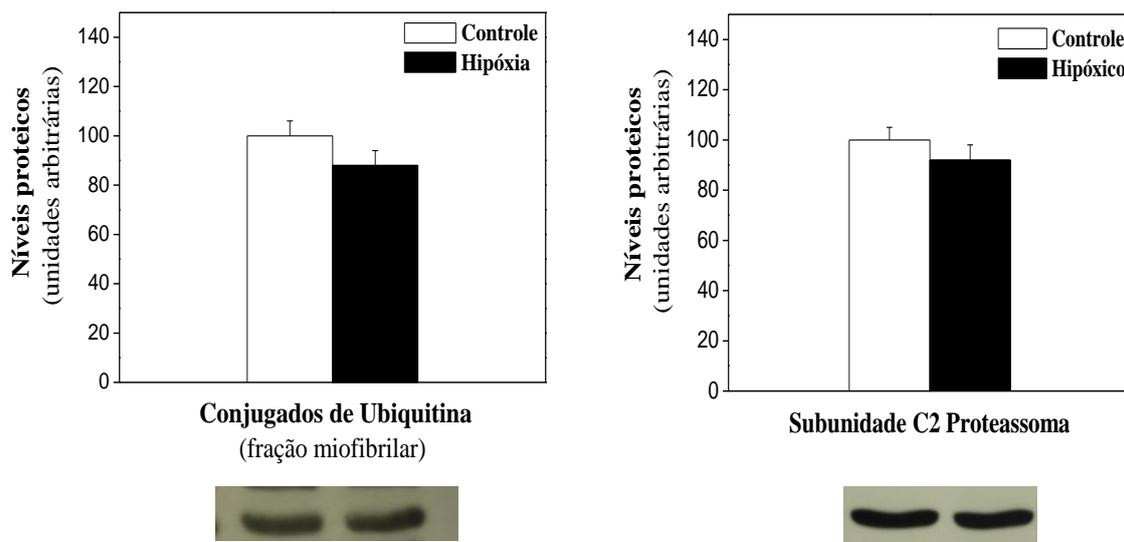


Figura 12. Conteúdos protéicos dos conjugados de ubiquitina (fração miofibrilar) e subunidade C2 do proteassoma de músculo EDL de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias.. Os valores são expressos como Média \pm EP (n=7).

4.8. Oxidação de glicose e palmitato pelos músculos esqueléticos.

Tendo em vista que os animais submetidos à HIC tornam-se mais tolerantes à sobrecarga de glicose, procedeu-se a investigação do estado de oxidação dos substratos energéticos pelo músculo esquelético neste modelo experimental. Para isso, os músculos *soleus* e EDL de animais controles e hipóxicos foram incubados na presença ou não de insulina e a oxidação de glicose e palmitato estimada por meio da incorporação da marca radioativa em CO₂. Como pode ser observado na Figura 13 ocorreu diminuição nas taxas de oxidação de glicose tanto em músculo *soleus* (Figura 13A) quanto em EDL (Figura 13B) incubados em meio basal sem insulina. As quedas nas taxas de oxidação foram de 45% e 56% para o músculo *soleus* e EDL, respectivamente. Quando os músculos da pata contralateral do mesmo animal foram

incubados com insulina não foram observadas alterações significantes nas taxas de oxidação de glicose.

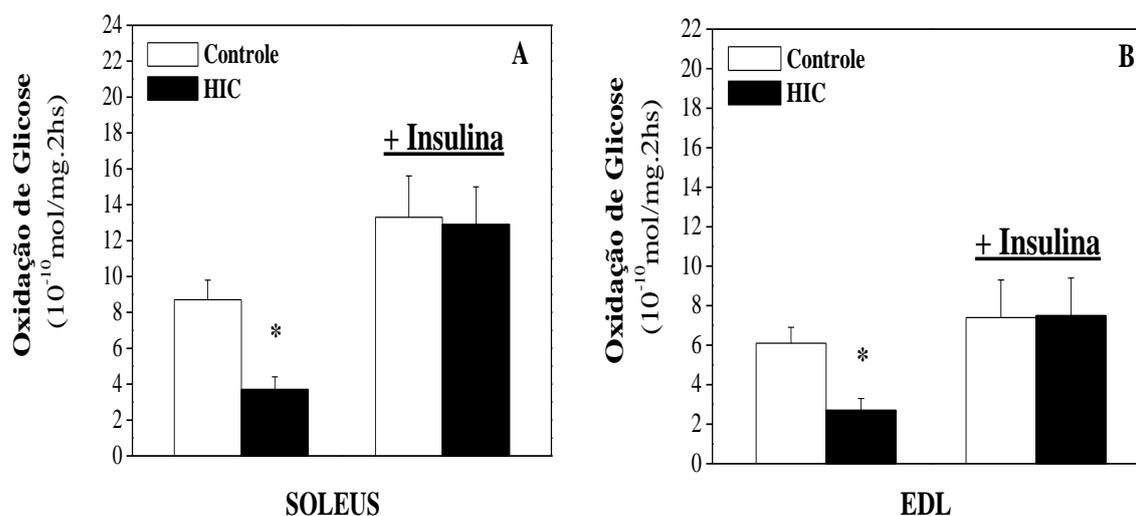


Figura 13. Oxidação de glicose em músculos *soleus* (A) e EDL (B), incubados ou não com insulina (50mU), de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias. Os valores são expressos como Média ± EP (n=6). * $P \leq 0.05$ em relação ao basal.

Confirmando dados prévios da literatura (SAGERSON et al., 1993, 1998; MUOIO et al., 1999), os valores de oxidação de palmitato nos músculos *soleus* e EDL de ratos controles foram reduzidos em 44% e 30%, respectivamente (Figura 14A e B), após a incubação com insulina. Embora os valores basais da oxidação de palmitato não tenham sido alterados pela hipóxia, este estímulo reverteu completamente o efeito inibitório da insulina em ambos os músculos. A reversão na oxidação de palmitato provocada pela HIC na presença de insulina foi de 44% em *soleus* e 92% em EDL.

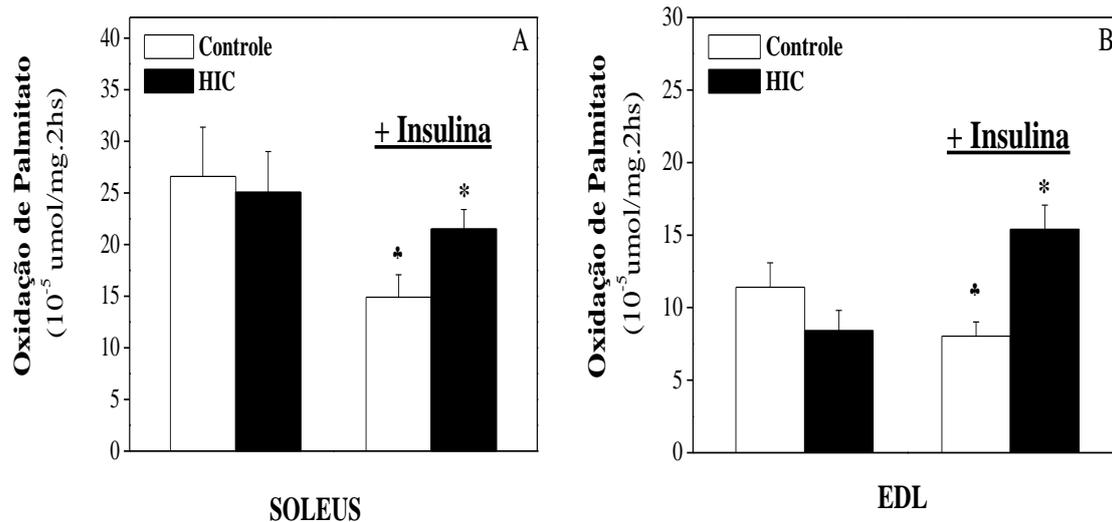


Figura 14. Oxidação de palmitato em músculos *soleus* (A) e EDL (B), incubados ou não com insulina (50mU), de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias. Os valores são expressos como Média ± EP (n=8). * $P \leq 0.05$ em relação ao controle com insulina. * $P \leq 0.05$ em relação ao basal.

4.9. Atividades enzimáticas dos componentes protéicos da cadeia respiratória de músculos *soleus*.

A Figura 15 apresenta a atividade das diferentes enzimas da cadeia fosforilativa corrigida pela atividade da citrato sintase da mitocôndria de músculos *soleus* de ratos submetidos à HIC. Em animais hipóxicos, foi observado um aumento da atividade (~45%) dos complexos CIII (ubiquinol citocromo C oxidorreductase) e CIV (citocromo C oxidase). Resultados semelhantes a estes foram também observados quando a atividade enzimática desses componentes foi expressa por miligrama de proteína (dados não mostrados). Os valores da atividade enzimática do complexo CI (NADH-ubiquinona oxidorreductase) de músculos de animais submetidos à hipóxia apresentaram uma importante tendência ao aumento quando comparados aos controles. A análise estatística não demonstrou diferença significativa entre a massa mitocondrial nos grupos hipóxicos e controles (estimada tanto pela enzima da matriz mitocondrial citrato sintase, quanto pela succinato-ubiquinona oxidorreductase, uma enzima da membrana mitocondrial interna).

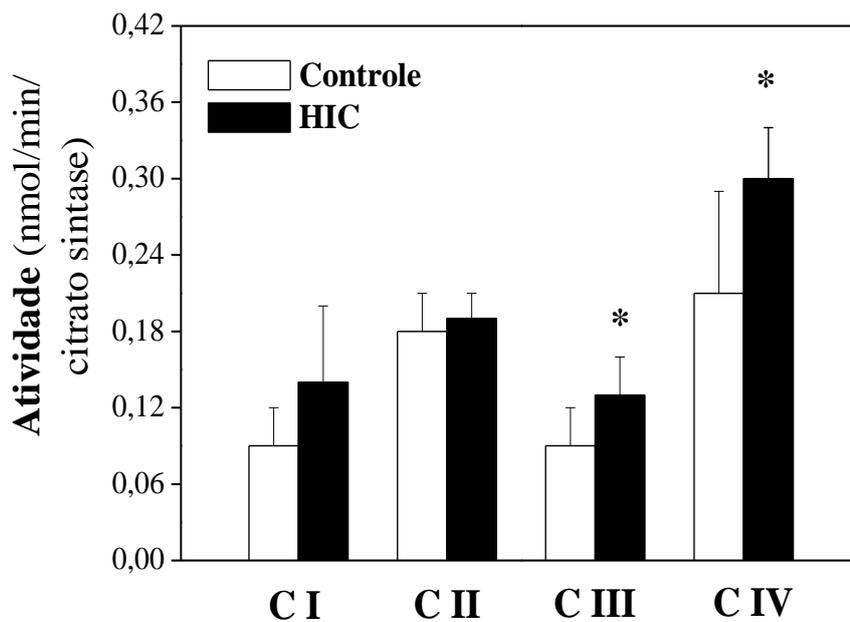


Figura 15. Atividade dos complexos enzimáticos da cadeia fosforilativa mitocondrial (corrigida pela atividade da citrato sintase) de músculos *soleus* de ratos controles e expostos à hipóxia intermitente crônica (HIC), durante 9 dias. Os resultados são expressos como Média \pm EP (n=7). * $P \leq 0,05$. C I: NADH-ubiquinona oxidorreductase, CII: succinato-ubiquinona oxidorreductase, CII: ubiquinol citocromo C oxidorreductase e CIV: citocromo C oxidase.

5. Discussão

O objetivo principal deste trabalho foi verificar os efeitos da HIC, durante 9 dias, no metabolismo protéico em músculos esqueléticos oxidativos (*soleus*) e glicolíticos (EDL) de ratos. Os principais achados foram: 1) a exposição crônica à hipóxia intermitente levou a uma diminuição no ganho de massa corporal dos animais, a qual foi acompanhada por uma atrofia das fibras musculares do tipo IIA e IIa/I e do *turnover* de proteínas (redução da síntese e degradação); 2) a diminuição da degradação protéica que ocorreu no músculo *soleus* em resposta à HIC foi devido a uma menor atividade da proteólise dependente de Ca^{+2} ; 3) o efeito inibitório da HIC na proteólise dependente de Ca^{+2} foi acompanhado por um aumento do conteúdo protéico da forma autolisada (ativa) da μ -calpaína e da calpastatina, indicando que este sistema proteolítico esteja reduzido provavelmente pelo predomínio da ação do seu inibidor endógeno, *i.e.* a calpastatina. Com relação às alterações do metabolismo de carboidratos e lipídios, observou-se que a HIC resultou em: 4) menor oxidação de glicose muscular acompanhada de acúmulo nos estoques de glicogênio muscular (*soleus*) e hepático e 5) maior oxidação de ácidos graxos como fonte de energia na presença da insulina *in vitro* e maior atividade dos complexos enzimáticos (CIII e CIV) da cadeia respiratória.

O modelo experimental utilizado nesse trabalho para o estudo dos efeitos da HIC no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos consistiu na exposição crônica de ratos (~70g) a um ambiente hipóxico. Os animais permaneceram nessas condições durante um período de 8h ao dia (9:30h às 17:30h), durante 9 dias. Vale a pena ressaltar que nas 16h restantes (17:30h às 9:30h), ou seja, durante o período noturno e

de alimentação, os animais permaneciam em um ambiente normóxico, conferindo assim o caráter de exposição intermitente e não contínuo à hipóxia. Devido ao período de exposição à hipóxia coincidir exatamente com o período de sono dos animais, este modelo tem sido utilizado na pesquisa básica para a melhor compreensão da fisiopatologia da síndrome da apnéia obstrutiva do sono. Esta síndrome é uma das complicações mais comuns da obesidade e é caracterizada por obstruções recorrentes das vias aéreas que resultam em períodos de hipóxia intermitente e fragmentação do sono (MORRELL et al., 2000). As complicações cardiovasculares associadas a esta síndrome são a hipertensão arterial, as doenças coronarianas e o acidente vascular cerebral (NIETO et al., 2000; PEPPARD et al., 2000; SHAHAR et al., 2001; PARRA et al., 2000). Mas, não existem relatos na literatura acerca de possíveis alterações de ganho ou perda de massa muscular esquelética em humanos com apnéia obstrutiva. Acredita-se que a hipertensão arterial desencadeada pela HIC seja decorrente da maior atividade do sistema nervoso simpático. De fato, está muito bem estabelecido que a ativação do quimiorreflexo elicitava excitação simpática (FRANCHINI & KRIEGER, 1993; MACHADO, 2001, 2004). Estudos prévios mostram que ratos jovens (com idade semelhante aos utilizados no presente estudo) submetidos à HIC exibem aumento da atividade simpática, como estimado por registros diretos do nervo simpático torácico (BRAGA et al., 2006). Além disso, SMITH et al. (2007) mostraram que ratos adultos submetidos à HIC aumentam a taxa de liberação dos grânulos de catecolaminas das células cromafins. O presente estudo corrobora esses dados já que a HIC induziu ativação da síntese de catecolaminas na medula da adrenal, avaliada indiretamente pelo aumento do conteúdo de dopamina na adrenal de ratos hipóxicos.

Embora nosso estudo não tenha detectado aumento significativo das concentrações plasmáticas das catecolaminas e nem no conteúdo de noradrenalina muscular, dados prévios da literatura mostram que humanos submetidos à HIC apresentam aumento do disparo no nervo simpático muscular (CUTLER et al., 2004). Além disso, tem-se demonstrado aumento dessa atividade mesmo sem haver alteração da noradrenalina plasmática (ROWELL et al., 1989). O significado funcional desse aumento da atividade simpática induzido pela hipóxia no metabolismo protéico do músculo esquelético é completamente desconhecido. O fato dos corações dos animais hipóxicos ter desenvolvido hipertrofia (Figura 3) é uma evidência indireta de que a HIC realmente levou à hiperativação simpática em nossos animais. De fato, estudos prévios têm mostrado uma clara correlação entre hiperatividade simpática e hipertrofia cardíaca (CHEN et al., 2006). O ganho de massa muscular cardíaca dos animais hipóxicos foi bastante similar àquela observada em ratos tratados com β_2 -agonistas como o clenbuterol (GONÇALVES, 2009) e também em modelos de camundongos transgênicos que possuem hiperatividade do sistema nervoso simpático (GILSBACH et al., 2007). Os mecanismos intracelulares envolvidos com a hipertrofia cardíaca induzida pela hiperatividade adrenérgica ainda não são completamente conhecidos e são alvos de investigações em nosso laboratório.

Sabendo-se que as ações da hipóxia são difusas sobre o organismo, tornou-se necessário conhecer as possíveis alterações físicas, metabólicas e hormonais induzidas pela HIC em nossos animais. Como se pode observar na Figura 1, o ganho de massa corporal dos ratos hipóxicos é menor do que a dos controles. Este efeito catabólico

promovido pela hipóxia já era esperado e ocorreu muito provavelmente devido à diminuição das taxas de síntese protéica nos diferentes tecidos.

De fato, as velocidades de síntese protéica nos músculos *soleus* e EDL foram reduzidas pela HIC (Figura 7A) e resultaram em uma menor massa dos músculos estudados (Figura 4A e 4B), sendo a atrofia do *soleus* resultante do menor diâmetro das fibras do tipo IIA e IIA/I (Figura 4C). Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que demonstram diminuição no ganho de massa muscular de animais submetidos à HIC (LAI et al. 2004). Nossos experimentos também confirmam dados anteriores de que a síntese protéica é reduzida em células musculares C2C12 (ARTHUR et al., 2000) e em músculos isolados de ratos expostos à hipóxia aguda (MANCHESTER & YOUNG, 1959; PREEDY & SUGDEN, 1989). Além disso, MORRISON et al. (1988) demonstraram que o mecanismo predominante de perda muscular em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) como o enfisema (doença na qual ocorre hipóxia devido destruição do parênquima pulmonar e prejuízo na troca gasosa) é a queda na taxa fracional de síntese protéica muscular que é acompanhada por uma queda generalizada no *turnover* protéico de todo o corpo.

Considerando que existe uma correlação direta entre perda de massa muscular esquelética e aumento dos hormônios tireoidianos (KETTELHUT et al., 1988; BENSO et al., 2007) e da corticosterona, um hormônio liberado classicamente em situações de estresse, investigou-se as concentrações plasmáticas desses hormônios em condições hipóxicas. Nossos resultados indicam que os efeitos observados na síntese protéica de músculos esqueléticos de ratos submetidos à HIC provavelmente não foram decorrentes de nenhum efeito indireto sobre a secreção da tiroxina e da

corticosterona, uma vez que a hipóxia não influenciou nenhum desses parâmetros. Classicamente, sabe-se que a hipóxia *per se*, via fator de transcrição HIF-1 α , pode inibir vias de sinalizações envolvidas com a ativação de processos anabólicos como o de crescimento e proliferação celular (LIU et al., 2006). Vale a pena ressaltar que a menor ganho de massa corporal promovido pela HIC também não pode ser atribuído a alterações do metabolismo lipídico já que a massa de diferentes sítios de tecido adiposo branco (epididimal e retroperitoneal) e o conteúdo dos ácidos graxos de carcaça não mostraram alterações. Além disso, tanto a ingestão alimentar (Figura 2) quanto o balanço hídrico (dados não mostrados) mostraram-se inalterados.

Paralelamente à redução da síntese protéica, observada tanto em *soleus* como em EDL, verificou-se, no presente trabalho, uma clara diminuição na proteólise total (Figura 7B), que curiosamente ocorreu apenas nos músculos *soleus*. A proteólise total no tecido muscular representa a participação concomitante de todos os sistemas de degradação protéica (lisossomal, dependente de Ca⁺² e dependente de Ub-proteassoma). São inexistentes na literatura trabalhos que tenham investigado as vias de degradação em músculos esquelético de roedores submetidos à HIC. Por isso, tornou-se interessante estudar qual(is) via(s) proteolítica(s) estaria(m) implicada(s) na degradação total dos músculos esqueléticos dos ratos hipóxicos. Como mostrado na Figura 8A, houve diminuição na atividade da via proteolítica Ca⁺²-dependente em *soleus*, sendo que não houve mudanças nas atividades dos sistemas proteolíticos lisossomal e ubiquitina-proteassoma. No músculo EDL não houve alteração nas atividades das vias proteolíticas (Figura 8B), o que correlata muito bem com a

proteólise total que também não mostrou nenhuma alteração significativa após a exposição à hipóxia (Figura 7B).

Um dos possíveis mecanismos que estariam participando da redução da proteólise total em *soleus* de ratos hipóxicos seria a atividade simpática aumentada, cujo papel fisiológico no controle do metabolismo protéico muscular é anabólico (NAVEGANTES et al., 2009). Essa idéia é proveniente de estudos anteriores de nosso laboratório que demonstraram que tanto a adrenalina como a noradrenalina são capazes de inibir a proteólise total em músculos esqueléticos de ratos normais *in vitro* (NAVEGANTES et al., 2000). Há evidências de que a infusão de adrenalina em humanos induz uma rápida diminuição na degradação protéica que pode ser prevenida pelo tratamento com propranolol, um antagonista do receptor β -adrenérgico (SHAMOON et al., 1980). Foi também demonstrado que o efeito inibitório *in vitro* das catecolaminas na proteólise total em músculo esquelético isolado de ratos (NAVEGANTES et al., 2000) está associado com uma redução na atividade do sistema proteolítico Ca^{+2} -dependente. Além disso, a atividade da proteólise Ca^{+2} -dependente é inibida em *soleus*, mas não em EDL, pela adição de clenbuterol (agonista β_2 adrenérgico) e do CL-316,243 (agonista β_3 adrenérgico) ao meio de incubação, um efeito que foi prevenido por antagonistas seletivos de adrenoceptores β_2 e β_3 , respectivamente. Em total concordância com estes resultados, foi demonstrado que o aumento na proteólise total observado em *soleus* de animais simpatectomizados foi acompanhado por um aumento da proteólise Ca^{+2} -dependente (NAVEGANTES et al., 2004). Várias características diferenciais relacionadas com a via de sinalização das catecolaminas entre músculos oxidativos (*soleus*) e glicolíticos

(EDL) ajudam a explicar porque apenas o músculo *soleus* foi responsivo ao efeito antiproteolítico induzido pela HIC. Há evidências de que músculos oxidativos como o *soleus* apresentam uma maior densidade de receptores β_2 -adrenérgicos, maior conteúdo total da subunidade α da proteína Gs (estimulatória), maior atividade da adenilato ciclase e da PKA (proteína kinase ativada por AMPc), assim como maior conteúdo da forma ativa (fosforilada) da proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (*cAMP-responsive element-binding protein*, CREB) quando comparados a músculos mistos como o gastrocnêmio e brancos como EDL (WILLIAMS et al., 1984; HOOVER et al., 2001; BEITZEL et al., 2007; XIE et al., 2007).

O sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} conta com a atividade de cisteína proteases conhecidas como calpaínas (COSTELLI et al., 2005). Duas isoformas têm recebido mais atenção da comunidade científica: a calpaína 1 ou micro (μ)-calpaína e a calpaína 2 ou mili (m)-calpaína. Essas denominações fazem referências às concentrações de Ca^{+2} *in vitro* necessárias para as ativações das mesmas. As duas isoformas são estruturalmente semelhantes: heterodímeros com peso molecular de 110 kDa constituídos por uma subunidade de 80 e outra de 30 kDa. O mecanismo básico que resulta na ativação do componente proteolítico dependente de Ca^{+2} depende do aumento da sensibilidade das calpaínas ao Ca^{+2} citosólico (SAIDO et al., 1994). Isso é resultante de um processo autoproteolítico (autólise) que remove um pequeno fragmento de ambas as subunidades da calpaína, gerando assim uma nova forma da molécula, a qual é ativa em concentrações de Ca^{+2} muito próximas àquelas encontradas no citosol (GOLL et al., 1992). Muito embora o conteúdo total das duas isoformas das calpaínas não tenha sido alterado pela HIC, observou-se no presente

trabalho que a forma autolisada (ativa) da subunidade de 75kDa da μ -calpaína foi aumentada em *soleus* de ratos expostos à HIC (Figura 9). Interessante foi o fato de que a forma não autolisada desta protease, ou seja, a sua forma inativa praticamente desapareceu após o estímulo hipóxico. Estes resultados são evidências indiretas de que a atividade enzimática da μ -calpaína em músculos *soleus* de ratos foi aumentada pela HIC, sendo este efeito muito provavelmente decorrente do aumento de Ca^{+2} intracelular promovido pela hipóxia (HIDALGO & DONOSO, 2008). De fato, diferentes estudos anteriores já haviam demonstrado uma correlação entre o influxo de Ca^{+2} e a ativação das calpaínas em cardiomiócitos (IIZUKA et al., 1992) e músculos esqueléticos (FAGAN et al., 1992) expostos ao estresse hipóxico agudo *in vitro*. Embora esta hipótese pareça bastante atraente, não se pode ignorar o fato de que as concentrações de Ca^{+2} necessárias para desencadear a autólise das calpains *in vitro* ainda sejam extremamente altas (10 μM), quando comparadas às concentrações citosólicas do Ca^{+2} livre (0.05-0.50 μM). No entanto, estudos realizados em cardiomiócitos de cobaias indicam que a atividade catalítica das calpaínas pode ser desencadeada por concentrações mais baixas de Ca^{+2} , em torno de 451 nM (MATSUMURA et al., 2001). A partir dessas observações, não se pode descartar a possibilidade de que outros fatores independentes do Ca^{+2} possam ter sido responsáveis pela ativação da autólise da μ -calpaína em músculos *soleus* de ratos hipóxicos.

As células que contêm calpaínas possuem também um inibidor endógeno específico para esta protease denominado de calpastatina, o qual já foi isolado de diversos tecidos, inclusive da musculatura esquelética (NAKAMURA et al., 1984).

Nossos resultados mostram pela primeira vez na literatura que a HIC aumenta a expressão protéica deste inibidor em músculos esqueléticos de ratos em condições *in vivo* (Figura 11). Esses dados corroboram estudos prévios da literatura que mostram que a expressão gênica de duas isoformas da calpastatina é aumentada em corações hipóxicos *in vitro* (LIN et al., 2004). Com base nessas evidências, podemos sugerir que o maior conteúdo de calpastatina observado em músculos *soleus* de animais expostos à HIC provavelmente bloqueou a atividade enzimática da μ -calpaína autolisada, sendo este o mecanismo intracelular responsável pela inibição do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} neste tipo de músculo (Figura 8A). A calpastatina previne a ativação da proteólise dependente de Ca^{+2} através da inibição da autólise da forma nativa da calpaína, de sua translocação para a membrana, assim como da expressão da atividade catalítica da calpaína autolisada (TAKANO & MAKI, 1999). Propomos nesse estudo que o aumento do conteúdo protéico da calpastatina observado em *soleus* de ratos expostos à hipóxia foi decorrente da hiperatividade simpática muscular desencadeada pela ativação do quimiorreflexo. Essa hipótese está totalmente de acordo com a literatura, uma vez que tem sido demonstrado que a atividade e a expressão gênica da calpastatina são aumentadas após a administração de agonistas β_2 -adrenérgicos (SAIDO et al., 1994; TAKANO & MAKI, 1999; CONG et al., 1998). Por exemplo, PARR et al. (2001) demonstraram aumento da expressão gênica e protéica da calpastatina após 16 horas de alimentação de porcos com clenbuterol. Resultados similares têm sido observados, em nosso laboratório, em músculos *soleus* de ratos normais tratados com clenbuterol durante 3 dias (GONÇALVES, 2009). Como os β_2 -agonistas ativam a PKA e esta atua no CRE das regiões promotoras da calpastatina

(CONG et al., 1998a, b), tem sido proposto que a calpastatina seja um alvo para esta quinase. Na verdade, a calpastatina é fosforilada pela PKA e sua atividade inibitória contra as calpaínas é aumentada pela fosforilação em músculos esquelético de ratos *in vitro* (PONTREMOLLI et al., 1992). Além disso, evidências recentes indicam que o gene promotor da calpastatina está aumentado em células de ratos L6G8 transfectados com dibutilil- cAMP (DBcAMP) ou forskolin (SENSKY et al., 2006), sugerindo que, tanto o gene promotor da calpastatina quanto a proteína em si, são alvos da atividade da PKA.

Esse conjunto de dados nos permite propor um modelo teórico (Figura 16) para melhor compreender o controle adrenérgico do metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos expostos à HIC. Segundo este modelo, a hipóxia levaria, inicialmente, ao aumento do influxo de Ca^{+2} e a consequente autólise das calpaínas na musculatura esquelética. Em paralelo, a ativação de adrenoceptores β_2 pelas catecolaminas liberadas pelo estímulo hipóxico levaria ao aumento do AMPc e à ativação da PKA e esta, por sua vez, agiria basicamente de duas maneiras no controle do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} : 1) aumentando a expressão gênica e protéica da calpastatina, 2) elevando os níveis de fosforilação deste inibidor. Essas duas ações, em conjunto, levariam à diminuição da atividade catalítica das calpaínas autolisadas e a inibição da proteólise dependente de Ca^{+2} .

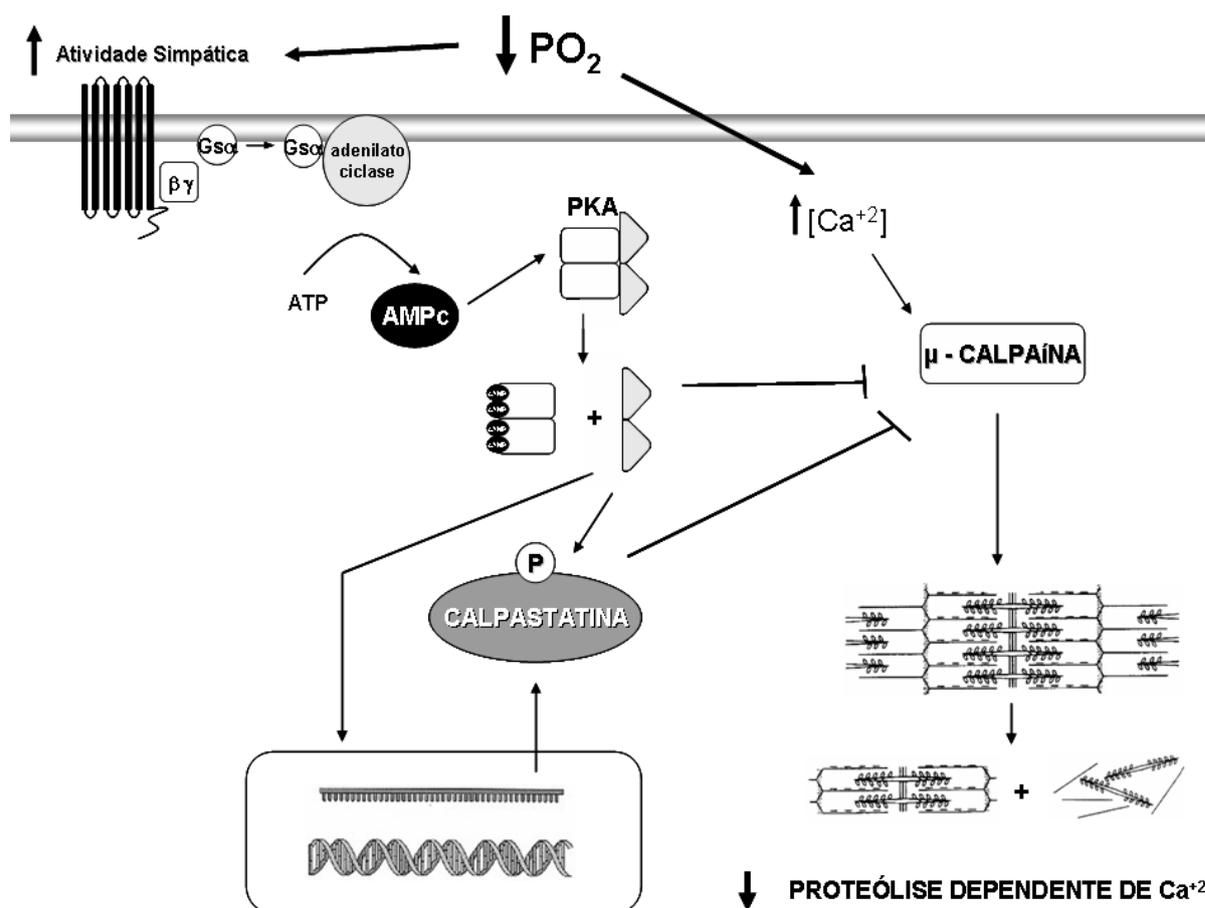


Figura 16. Modelo hipotético dos mecanismos envolvidos na inibição da proteólise dependente de cálcio em músculos soleus de ratos, durante a diminuição crônica intermitente da tensão arterial de oxigênio.

A via de sinalização de adrenoceptores β_2 /AMPc/PKA, aparentemente mais ativa em músculos oxidativos como o *soleus*, poderia justificar o motivo pelo qual somente este tipo muscular tenha respondido à HIC. Nota-se também o fato deste mecanismo antiproteolítico não estar presente em músculos ricos em fibras glicolíticas como o EDL, onde não se observou inibição da atividade proteolítica dependente de Ca^{+2} em resposta à hipóxia. Interessante que, ao contrário do músculo *soleus*, também não se verificou inibição da atividade deste sistema proteolítico em músculos EDL de ratos

tratados com clenbuterol por um curto intervalo de tempo (GONÇALVES, 2009) e nem aumento de sua atividade após a simpatectomia química (NAVEGANTES et al., 1999). Analisando os resultados da morfometria, demonstrou-se no presente estudo que a perda de massa de músculos *soleus* expostos à HIC ocorreu devido à atrofia das fibras musculares tipo IIa/I e IIa, as quais sabidamente possuem um tipo de metabolismo mais glicolítico quando comparadas às demais fibras existentes nos músculos oxidativos como o *soleus*. O número total dos tipos de fibras não foi alterado nos músculos *soleus*, o que, aparentemente, demonstra que não ocorreu interconversão das mesmas. Com base nessas evidências experimentais, podemos sugerir que as fibras oxidativas sejam mais resistentes aos efeitos catabólicos da hipóxia quando comparadas às fibras glicolíticas. De fato, vários autores têm demonstrado que a perda de massa de músculos oxidativos é muito menor do que a de músculos glicolíticos em resposta a diferentes modelos de atrofia como, por exemplo, o diabetes, o jejum e o tratamento com glicocorticóides (WANG et al., 2006; WILLIAMS et al., 1999; WING et al., 1991). Assim, tem sido proposta a existência de mecanismos compensatórios na musculatura oxidativa que a tornam mais resistente à atrofia. Nesse contexto, o presente trabalho sugere que o aumento da expressão protéica da calpastatina em resposta à hiperativação simpática desencadeada pelo estímulo hipóxico em músculos tonicamente ativos como o *soleus*, onde a síntese protéica já está reduzida, constitua um mecanismo compensatório que tem como função prevenir uma perda adicional de massa muscular em um período crítico do desenvolvimento do animal. Esta hipótese é reforçada pelas evidências de que a hiperexpressão transgênica da calpastatina em

músculos esqueléticos de camundongos previne a atrofia muscular decorrente do desuso (TIDBALL & SPENCER, 2002).

Tendo em vista estudos clínicos que indicam que a resistência à insulina e a intolerância à glicose são também frequentes em pacientes com apnéia do sono, tornou-se interessante investigar neste trabalho o perfil do metabolismo de carboidratos e lipídios para saber quais possíveis alterações poderiam estar ocorrendo nesses animais e que poderiam estar implicadas com o menor ganho de massa corporal. Inicialmente, as concentrações plasmáticas de glicose e lactato foram mensuradas em animais hipóxicos, não tendo sido encontradas diferenças significativas em relação aos animais controles. Já em relação ao conteúdo de glicogênio hepático e muscular houve um aumento considerável de ~70% em ambos os tecidos (Figura 6 A e B). SAVRANSKY et al. (2007) observaram efeito semelhante no conteúdo de glicogênio hepático quando camundongos foram submetidos à HIC. SILVERMAN et al. (1997) também observaram aumento do conteúdo de glicogênio em miócitos de ratos expostos à hipóxia *in vitro*. Estes efeitos anabólicos da hipóxia, aparentemente paradoxais do ponto de vista energético, podem ser compreendidos uma vez que a síntese de glicogênio não depende de ATP e sim de UDP (LEHNINGER et al., 1993). Vale a pena ressaltar que a elevação do glicogênio detectada tanto no fígado como no músculo *soleus* de ratos submetidos à HIC foi detectada ~15h após o último ciclo hipóxico e ocorreu, provavelmente, como parte de uma resposta adaptativa do animal no sentido de restabelecer as reservas glicídicas depletadas durante o estresse hipóxico. De fato, o conteúdo de glicogênio hepático foi praticamente depletado em um grupo de ratos sacrificados imediatamente após o

último ciclo hipóxico, ou seja, às 17:30h (dados não mostrados). A ativação da glicogenólise é um efeito adrenérgico clássico e provavelmente foi resultante da hiperativação simpática desencadeada em resposta à ativação do quimiorreflexo. Essa hipótese está de acordo com os estudos de IYORI et al. (2007) que verificaram que a liberação de glicose pelo fígado é mais pronunciada em ratos intactos quando comparados a ratos tratados com hexametônio, um bloqueador ganglionar simpático.

Em seguida, avaliou-se o efeito da HIC na oxidação de glicose em músculos incubados na ausência ou presença da insulina. Os resultados apresentados na Figura 13 mostram que, em situações basais, a HIC resulta em menor oxidação de glicose em ambos os tipos de músculos estudados (*soleus* e EDL) e que músculos hipóxicos e controles respondem de forma semelhante ao efeito estimulatório da insulina na oxidação de glicose. O fato do músculo *soleus* dos animais hipóxicos estar oxidando menos glicose e acumulando mais glicogênio do que seu respectivo controle sugere que a musculatura esquelética oxidativa, em condições de HIC, desvie esse substrato energético da rota de oxidação para utilizá-lo preferencialmente como fonte para a síntese de glicogênio, sendo este efeito, aparentemente, independente da insulina. De fato, FISHER et al. (2002) demonstraram que a hipóxia *in vitro* aguda promove aumento da utilização da glicose pelo músculo esquelético por meio da ativação de vias de sinalização intracelular diferentes da via da PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase), a via clássica da ação da insulina no controle do metabolismo de carboidratos. Além disso, NIKLASSON et al. (2000) demonstraram que a utilização de glicose no músculo esquelético foi eficientemente aumentada pela isquemia tanto em indivíduos saudáveis como em diabéticos do tipo 2, sugerindo a existência de vias alternativas à via de

sinalização da insulina no controle da utilização de glicose pelo músculo em situações isquêmicas.

Como foi verificada uma diminuição da oxidação de glicose basal e um aumento da atividade enzimática de dois componentes da cadeia respiratória em músculos *soleus* dos ratos hipóxicos (Figura 15), tornou-se interessante investigar qual substrato energético estaria sendo utilizado por esses músculos. Para este fim, foi mensurada a oxidação de palmitato em músculos *soleus* e EDL incubados ou não com insulina (Figura 14). Como esperado, ambos os músculos (*soleus* e EDL) dos animais controles diminuíram a oxidação do palmitato em resposta à insulina (WINDER & HOLMES, 2000). Porém, isto não foi observado quando músculos dos animais hipóxicos foram incubados na presença do hormônio, indicando que músculos esqueléticos de ratos expostos à HIC oxidam muito mais palmitato em resposta à insulina do que músculos de animais mantidos em ambiente de normóxia. Sugerimos que esse fenômeno possa ser atribuído à ativação da AMPK, uma enzima que, sabidamente, aumenta o catabolismo de lipídios em diferentes tecidos expostos à situações hipóxicas ou de exercício físico. (THOMSON & WINDER, 2009).

Por induzir fosforilação e inativação da acetil-CoA carboxilase, a AMPK diminui o conteúdo de malonil-CoA e, conseqüentemente, libera a inibição da carnitina palmitoil transferase do tipo 1 (CPT-1), permitindo assim o aumento da β -oxidação dos ácidos graxos (SULLIVAN et al., 1994). WINDER & HOLMES (2000) relataram que o efeito inibitório da insulina na oxidação de palmitato em patas perfundidas foi completamente prevenido pelo AICAR, um agonista sintético da AMPK. A hipótese de que a AMPK esteja realmente participando das alterações metabólicas descritas no

presente estudo é reforçada pelo fato desta enzima ser ativada diretamente pelas ERO geradas no complexo III da mitocôndria (EMERLING et al., 2009), um complexo cuja atividade enzimática está aumentada nos músculos *soleus* dos animais submetidos à HIC (Figura 15). O aumento da atividade do complexo IV da mitocôndria de músculos *soleus* de animais hipóxicos, encontrado no presente estudo, correlata muito bem com os achados de SAULEDA et al. (1998) que mostram que músculos esqueléticos de pacientes com DPOC apresentam aumento semelhante da atividade enzimática deste complexo. É possível que isto se deva também à ação da AMPK, uma vez que estudos anteriores (STEINBERG & KEMP, 2009) mostraram aumento da atividade nas enzimas mitocondriais quando um composto sintético que mimetiza o AMPK, o AICAR, foi utilizado. Portanto, a baixa tensão arterial de O₂ implicaria na maior produção mitocondrial de ERO, as quais ativariam a AMPK e esta, por sua vez, atuaria aumentando a atividade das enzimas dos complexos mitocondriais, gerando assim mais ERO em um sistema de retroalimentação positiva.

Em conjunto, esses resultados mostram que à semelhança do que acontece durante o exercício, a HIC induz adaptações que possibilitam maior aproveitamento dos ácidos graxos como fonte de energia, ao mesmo tempo em que o glicogênio muscular é preservado. Segundo alguns autores (BERGSTROM et al., 1972), a preservação do conteúdo de glicogênio em situações de demanda energética como, por exemplo, o exercício, é um fator determinante para o desempenho motor dos animais. O mesmo poderia estar acontecendo em nosso modelo experimental de HIC. Enquanto os ácidos graxos atuariam como fonte energética principal, o glicogênio seria importante para a manutenção da atividade do ciclo de Krebs na geração de

oxalacetato. O fornecimento do oxalacetato seria, portanto, um fator limitante, já que o acetil CoA, proveniente do ácido graxo, reage com este para a formação de citrato, pela citrato sintase, com posterior fornecimento de ATP (CURI et al., 2003). O fato de termos demonstrado que a oxidação de ácidos graxos aumenta apenas em músculos de ratos hipóxicos incubados na presença de insulina corrobora a hipótese de que a capacidade do músculo esquelético em oxidar ácidos graxos apresenta relação íntima com a oferta e metabolização de glicose, quer seja esta proveniente do plasma ou da degradação do glicogênio muscular. Propõe-se que a oxidação de ácidos graxos, para ser máxima, requer metabolização de glicose em taxas apropriadas. Quando a oferta de glicose é elevada, o malonil-CoA gerado inibe a CPT-I e reduz a oxidação de ácidos graxos. Por sua vez, na depleção de glicogênio, faltam esqueletos de carbono para manter o fluxo de metabólitos pelo ciclo de Krebs funcionando (CURI et al., 2003).

É imprescindível que, em situações de baixa produção de ATP ou de alta demanda energética como o exercício, a utilização dos AG seja a maior possível justamente para que a quebra do glicogênio muscular e a oxidação de glicose circulante sejam as menores possíveis. A hipótese que parece melhor explicar esse "desvio" do metabolismo dos carboidratos para os lipídios é o ciclo de Randle (FELBER, 1990). No entanto, ainda não está muito bem estabelecido qual é a principal fonte de ácidos graxos disponíveis para oxidação nos músculos esqueléticos. Considerando-se que toda elevação da disponibilidade de ácidos graxos circulantes resulta em maior oxidação deste substrato, seria esperado encontrar no grupo hipóxico um aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres, resultante da estimulação da lipólise pelas catecolaminas. No entanto, nossos resultados mostram o

oposto, ou seja, redução destas concentrações no plasma de animais submetidos à HIC. Um provável aumento do *turnover* de ácidos graxos induzido pela HIC nos diferentes tecidos incluindo o muscular poderia explicar esses achados. Futuros experimentos serão realizados para testar essa hipótese. Estudos anteriores já mostraram que o tratamento com AICAR aumenta a captação de ácidos graxos no coração (LUIKEN et al., 2003; SHEARER et al., 2005) e músculo esquelético (SHEARER et al., 2004; STEINBERG et al., 2004) de ratos durante o exercício. Portanto, esses dados são sugestivos de que a captação de AGL pelo músculo esquelético é mediada por um transportador saturável e que a AMPK aumenta a capacidade máxima para o transporte de AGL no músculo esquelético, possivelmente por elevar o conteúdo de carreadores de ácidos graxos. Estes efeitos promovidos pela AMPK sobre a captação de ácidos graxos poderiam também explicar a queda das concentrações plasmáticas de AGL e o aumento da oxidação deste substrato encontrado nos músculos esqueléticos dos animais submetidos à HIC.

Vários outros efeitos metabólicos descritos no presente trabalho em músculos de ratos submetidos à HIC coincidem com ações clássicas da AMPK (HARDIE, 2003, 2008; XI et al., 2001). Dentre estes, podemos citar a inibição da síntese protéica, a estimulação da síntese do glicogênio e o aumento do transporte de glicose. Futuros experimentos serão necessários para confirmar a participação da AMPK como a enzima chave na regulação dessas múltiplas respostas assim como sua eventual modulação pelo sistema nervoso simpático em ratos submetidos à HIC.

Além da AMPK, vários outros mecanismos compensatórios podem ser ativados em resposta ao desafio energético a que a célula é submetida. Por exemplo,

POLOTSKY et al. (2003) verificaram que a HIC de curta duração (5 dias) em camundongos aumenta os níveis séricos de leptina e demonstraram que este hormônio exerce um papel importante no aumento da tolerância à glicose e na prevenção da resistência à insulina que acompanha a exposição mais prolongada ao estímulo hipóxico. Vias de sinalização dependentes do aumento do Ca^{+2} intracelular como, por exemplo, a da proteína quinase dependente de Ca^{+2} e calmodulina, também parecem participar da translocação de transportadores de glicose do tipo 4 em músculos esqueléticos de animais submetidos a diferentes modelos de hipóxia (CARTEE et al., 1991; WRIGHT et al., 2005). Um mecanismo bastante intrigante é que a atividade do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} , e mais especificamente a das calpaínas, possa estar relacionada ao controle do metabolismo de carboidratos. OTANI et al. (2004, 2006) demonstraram que a inibição farmacológica das calpaínas resultou em aumento da tolerância à glicose e que camundongos transgênicos que hiperexpressam calpastatina aumentam em aproximadamente três vezes o conteúdo de GLUT4 na musculatura esquelética. Curiosamente, estes efeitos foram associados ao aumento do conteúdo protéico da AMPK no músculo, que é uma enzima alvo da ação catalítica das calpaínas (OTANI et al., 2004, 2006).

Independentemente da causa e dos mediadores intracelulares envolvidos, todos os ajustes adaptativos que ocorrem em animais submetidos a ciclos intermitentes de hipóxia parecem ser importantes no sentido de preparar o organismo para a situação de demanda energética, de tal forma que a produção de ATP seja mantida e a disfunção metabólica minimizada.

6. Conclusões

Os resultados do presente trabalho corroboram dados anteriores de nosso laboratório obtidos em animais, em situações normais, e sugerem que a maior atividade do sistema nervoso simpático em ratos submetidos à HIC por 9 dias reduz a proteólise dependente de Ca^{+2} em músculos oxidativos por meio do aumento do conteúdo de calpastina, o inibidor endógeno das calpaínas.

Com relação ao metabolismo de carboidratos e lipídios na musculatura esquelética, pode-se concluir que, na HIC, a glicose é desviada da rota de oxidação sendo utilizada preferencialmente na via de síntese de glicogênio. Nessa situação, os músculos esqueléticos passam a oxidar ácidos graxos de forma mais eficiente, o que resulta em um aumento da atividade da cadeia respiratória e, muito provavelmente, na manutenção da produção de ATP.

Com base nesses resultados, pode-se concluir que ratos submetidos à HIC, durante 9 dias, desenvolvem ajustes adaptativos no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios, no sentido de prevenir a perda de massa muscular esquelética e de manter a produção de ATP.

7. Referências Bibliográficas

ARTHUR PG, GILES JJ, WAKEFORD CM. Protein synthesis during oxygen conformance and severe hypoxia in the mouse muscle cell line C2C12. **Biochim et Biophys Acta** .1475: 83-89. 2000.

BARDSLEY RG, ALLCOCK SM, DAWSON JM, DUMELOW NW, HIGGINS JA, LASSLETT YV, LOCKLEY AK, PARR T, BUTTERY PJ. Effect of beta-agonists on expression of calpain and calpastatin activity in skeletal muscle. **Biochimie**. 74(3): 267-273. 1992.

BARKER D, AND SAITO M. Autonomic innervation of receptors and muscle fibers in cat skeletal muscle. **Proc. R. Soc. Lond**. 212: 317-332. 1981.

BAVIERA AM, ZANON NM, NAVEGANTES LCC, MIGLIORINI RH, KETTELHUT IC. Pentoxifiline inhibits Ca²⁺-dependent and ATP proteasome – dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2007. 292(3): E702-E708.

BEITZEL F, SILLENCE MN, LYNCH GS. β -Adrenoceptor signaling in regenerating skeletal muscle after β -agonist administration. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 293: E932–E940. 2007.

BENSO A, BROGLIO F, AIMARETTI G, LUCATELLO B, LANFRANCO F, GHIGO E, GROTTOLI S. Endocrine and metabolic responses to extreme altitude and physical exercise in climbers. **Eur J Endoc.** 157: 733–740. 2007.

BERGSTRÖM J, HULTMAN E, ROCH-NORLUND AE. Muscle glycogen synthetase in normal subjects. Basal values, effect of glycogen depletion by exercise and of a carbohydrate-rich diet following exercise. **Scand. J .clin. Lab. Invest.** 2: 231-6. 1972.

BERNE RM, LEVY MN, KOEPPER BC, STANTON BA. **In: Fisiologia.** 5ª edição. São Paulo. Editora Elsevier Ltda. 2004. cap 11, pg 221.

BIRCHMACHIN MA, BRIGGS HL., SABORIDO AA, BINDOFF LA, TURNBULL DM. An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. **Biochem Med Met Metab Biol.** 51: 35-42. 1994.

BRAGA VA, SORIANO RN AND MACHADO BH. Sympathoexcitatory response to peripheral chemorreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia. **Exp Physio.** 91.6: 1025-1031. 2006.

BRUNELLE JK, BELL EL, QUESADA NM, VERCAUTEREN K, TIRANTI V, ZEVIANI M, SCARPULLA RC, CHANDEL NS. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. **Cell Metab.** 1: 409–14. 2005.

BUNN HF AND POYTON RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. **Physiol. Rev.** 76: 839–885. 1996.

CANDINAS D, STROKA DM, BURKHARDT T, DESBAILLETS I, WENGER RH, NEIL DAH, BAUER C, GASSMANN M. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. **FASEB J.** 15: 2445–2453. 2001.

CARROL NV, LONGLAY RW, ROE JH. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. **J Biol Chem.** 220: 583-593. 1956.

CARTEE GD, DOUEN AG, RAMLAL T, KLIP A, AND HOLLOSZY JO. Stimulation of glucose transport in skeletal muscle by hypoxia. **J Appl Physiol.** 70: 1593–1600, 1991.

CHEN LM, KUO WW, YANG JJ, WANG SGP, YEH YL, TSAI FJ, HO YJ, CHANG MH, HUANG CY AND SHIN-DA LEE. Eccentric cardiac hypertrophy was induced by long-term intermittent hypoxia in rats. **Exp Physiol.** 92.2: 409–416. 2006.

CHIU LL, CHOU SW, CHO YM, HO HY, IVY JL, HUNT D, WANG PS, KUO CH. Effect of prolonged intermittent hypoxia and exercise training on glucose tolerance and muscle GLUT4 protein expression in rats. **J Biomed Sci.** 11: 838-846. 2004.

CONG M, GOLL DE, ANTIN PB. cAMP responsiveness of the bovine calpastatin gene promoter. **Biochim. Biophys. Acta.**1443: 186-192. 1998a.

CONG M, THOMPSON VF, GOLL DE, ANTIN PB. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for AMPc-dependent protein kinase activity. **J. Biol. Chem.** 27: 660-666 1998b.

COSTELLI P, GARCÍA-MARTÍNEZ C, LLOVERA M, CARBÓ N, LÓPEZ-SORIANO FJ, AGELL N, TESSITORE L, BACCINO FM, ARGILÉS JM. Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. **J Clin Invest.** 95(5): 2367-72. 1995.

CURI R, LAGRANHA CJ, JAIR RODRIGUES GJ, PITHON-CURI TC, LANCHETA JR AH; PELLEGRINOTTI IL, PROCOPIO J. The Krebs cycle as limiting factor for fatty acids utilization during aerobic exercise. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 47 (2): 135-143. 2003.

CUTLER MJ, SWIFT NM, KELLER DM, WASMUND WL, SMITH ML. Hypoxia-mediated prolonged elevation of sympathetic nerve activity after periods of intermittent hypoxic apnea. **J Appl Physiol.** 96: 754–761. 2004.

DIMAURO S, SERVIDEI S, ZEVIANI M, DIROCCO M, DEVIVO DC, DIDONATO S, UZIEL G, BERRY K, HOGANSON G, JOHNSEN SD, JOHNSON PC. Cytochrome *c* oxidase deficiency in leigh syndrome. **Ann Neurol.** 22: 498-506. 1987.

EMERLING BM, TORMOS KV, CHANDEL NS. Compound C inhibits hypoxic activation of HIF-1 independent of AMPK. **FEBS Lett.** 581(29): 5727–5731. 2007.

EMERLING BM, WEINBERG F, SNYDER C, BURGESS Z, MUTLU GM , VIOLLET B, BUDINGER GRS, CHANDEL NS. Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. **Free Radical Biology & Medicine.** 46: 1386–1391. 2009.

FAGAN JM, WAJNBERG EF, CULBERT L AND WAXMAN L. ATP depletion stimulates calcium-dependent protein breakdown in chick skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 26: E637-E643. 1992.

FAGAN JM, TISCHLER ME. Effects of oxygen deprivation on incubated rat *soleus* muscle. **Life Sci.** 44(10): 677-81. 1989.

FAUCHER M, GUILLOT C, MARQUESTE T, KIPSON N , MAYET-SORNAY MH, DESPLANCHES D, JAMMES Y AND BADIER M. Matched adaptations of electrophysiological, physiological, and histological properties of skeletal muscles in response to chronic hypoxia. **Pfluegers Arch – Eur J Physiol.** 450: 45-52. 2004.

FELBER JP. Significance of the Randle-Mechanism in the etiology of diabetes type II. **Horm Metab Res.** 22: 11-7.1990.

FISHER JS, GAO J, HAN DH, HOLLOSZY JO, NOLTE LA. Activation of AMP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. **Am J Physiol Endocrinol Metabol.** 282: E18–E23. 2002.

FLETCHER, EC. Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. **J. Appl. Physiol.** 90: 1600–1605. 2001.

FRANCHINI KG & KRIEGER EM. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **J Auton Nerv Syst.** 42: 63–69. 1993.

GAROFALO MA, KETTELHUT IC, ROSELINO JE, MIGLIORINI RH. Effect of acute cold exposure on norepinephrine *turnover* rates in rat white adipose tissue. **J Auton Nerv Syst.** 60(3): 206-8. 1996.

GILSBACH R, BREDE M, BEETZ N, MOURA E, MUTHIG V, GERSTNER C, BARRETO F, NEUBAUER S, VIEIRA-COELHO MA, HEIN L. Heterozygous $\alpha 2C$ -adrenoceptor-deficient mice develop heart failure after transverse aortic constriction. **Cardiovasc Res.** 75: 728–737. 2007.

GOLL DE, DAYTONN WR, SINGH I, ROBSON RM. Studies of the α -actinin/actin interaction in the Z-disc by using calpain. **J Biol Chem.** 266: 8501-8510. 1991

GONÇALVES DAP. Mecanismos envolvidos na ação anabólica e anticatabólica do agonista adrenérgico β 2 no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos. Ribeirão Preto, 2009. 99p. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

GUYTON AC, HALL JE. In: **Textbook of Medical Physiology.** 9th ed. Philadelphia, Pennsylvania. W. B. Saunders Company; 1996. Chapter. 72, pg 903-09.

HANADA A, SANDER M AND ALONSO JG. Human skeletal muscle sympathetic nerve activity, heart rate and limb haemodynamics with reduced blood oxygenation and exercise. **J Physiol.** 551: 635-647. 2003.

HARDIE DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. **Endocrinology.** 144(12): 5179–5183. 2003.

HARDIE DG. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. **International Journal of Obesity.** 32: S7–S12. 2008.

HIDALGO C AND DONOSO P. Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxid. Redox Signal.** 10: 1275–1312. 2008.

HIDALGO C, BULL R, BEHRENS MI, AND DONOSO P. Redox regulation of RyR-mediated Ca₂₊ release in muscle and neurons. **Biol Res.** 37: 539–552. 2004.

HIDALGO C, ARACENA P, SANCHEZ G, AND DONOSO P. Redox regulation of calcium release in skeletal and cardiac muscle. **Biol Res.** 35: 183–193. 2002.

HOCHACHKA PW, BUCK LT, DOLL CJ AND LAND SC. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93: 9493-9498. 1996.

HOOVER F, MATHIESEN I, SKALHEGG BS, LOMO T, TASKEN K. Differential expression and regulation of the PKA signalling pathway in fast and slow skeletal muscle. **Anat Embryol.** 203(3): 193-201. 2001.

IIZUKA K, KAWAGUCHI H, YASUDA H, KITABATAKE A. The role of calcium activated neutral protease on myocardial cell injury in hypoxia. **Jpn Heart J.** 33(5): 707-15. 1992.

IYORI N, ALONSO LC, LI J, SANDERS MH, GARCIA-OCANA A, O'DOHERTY, POLOTSKY VY AND O'DONNELL CP. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. **Am J Resp Crit Care Med.** 175: 851-857. 2007.

JAAKKOLA P, MOLE DR, TIAN YM, WILSON MI, GIELBERT J, GASKELL SJ, KRIEGSHEIM A., HEBESTREIT HF, MUKHERJI M, SCHOPELD CJ, MAXWELL PH, PUGH CW, RATCLIFFE PJ. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. **Science.** 292: 468–472. 2001.

KARA T, NARKIEWICZ K AND SOMERS VK. Chemoreflexes- physiology and clinical implications. **Acta Physiol. Scand.** 177: 377–384. 2003.

KETTELHUT IC, LEOPOLD B, TAWA NE, GOLDBERG AL. Protein deficiency and lack of pituitary hormones reduce both lysosomal and ATP-depedent (nonlysosomal) proteolytic processes in skeletal muscle. **Fed.Proc.** (2): 564. 1988b.

KETTELHUT IC, WING SS, GOLDBERG AL. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. **Diab Metab Rev.** 4 (8): 751-72. 1988.

KETTELHUT IC, PEPATO MT, MIGLIORINI RH, MEDINA R, GOLDBERG AL. Regulation of different proteolytic pathways in skeletal muscle in fasting and diabetes mellitus. **Braz J Med Biol Res.** 27 (4): 981-93. 1994.

KURI BA, KHAN SA, CHAN SA, PRABHAKAR NR SMITH CB. Increased secretory capacity of mouse adrenal chromaffin cells by chronic intermittent hypoxia: involvement of protein kinase C. **J Physiol.** 584.1: 313–319. 2007.

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227:680-685. 1970.

LAI CJ, YANG CCH, HSU YY, LIN YN, KUO TBJ. Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats. **J Appl Physiol.** 100: 1974–1982. 2006.

LECKER SH, GOLDBERG AL, MITCH WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **J Am Soc Nephrol.** 17(7):1807-19. 2006.

LECKER SV, MITCH WE AND GOLDBERG AL. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease state. **J Nutr.**129: 227S-237S. 1999.

LEHNINGER AL, NELSON DL, COX MM. **Principles of biochemistry**. 2nd. USA. Worth Publishers; 1993. Chapter 19, pg 611-18.

LIU L, CASH TP, JONES RG, KEITH B, THOMPSON CB, SIMON MC. Hypoxia-Induced Energy Stress Regulates mRNA Translation and Cell Growth. **Molecular Cell**. 21: 521–531. 2006.

LOWELL BB, RUDERMAN NB, GOODMAN MN. Evidence that lysosomes are not involved in the degradation of myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. **Biochem J**. 234(1): 237-240. 1986.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. **J Biol Chem**. 193: 265-275. 1951.

LUIKEN JJ, COORT SLM, WILLEMS J, COUMANS WA, BONEN A, VAN DER VUSSE GJ, GLATZ JFC. Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP activated protein kinase signaling. **Diabetes**. 52: 1627– 1634. 2003.

MACHADO BH. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. **Ann N Y Acad Sci**. 940:179–196. 2001.

MACHADO BH. Chemoreflex and sympathoexcitation. **In Neural Mechanisms of Cardiovascular Regulation**, ed. Dun NJ, Machado BH & Pilowsky PM. Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, USA; 2004. pp. 31–58.

MANCHESTER KL, YOUNG FG. Hormones and protein biosynthesis in isolated rat diaphragm. **J Endocrinol.** 18: 381-94.1959.

MATSUMURA Y, SAEKI E, OTSU K, MORITA T, TAKEDA H, KUZUYA T, HORI M, KUSUOKA H. Intracellular calcium level required for calpain activation in a single myocardial cell. **J. Mol. Cell Cardiol.** 33: 1133-1142. 2001

MORRELL MJ, FINN L, KIM H, PEPPARD PE, BADR MS, YOUNG T. Sleep fragmentation, awake blood pressure, and sleep-disordered breathing in a population-based study. **Am J Respir Crit Care Med.** 162: 2091–2096. 2000.

MORRISON WL, GIBSON JN, SCRIMGEOUR C, RENNIE MJ. Muscle wasting in emphysema. **Clin Sci.** 75: 415-420. 1988.

MUELLER RA, THOENEN H, AXELROD J. Adrenal tyrosine hydroxylase: compensatory increase in activity after chemical sympathectomy. **Science.** 163: 468-469. 1969.

MUOIO DB, SEEFELD K, WITTERS LA AND COLEMAN RA. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. **Biochem. J.** 338: 783-791. 1999.

NAVEGANTES LCC, BAVIERA AM , KETTELHUT IC. The inhibitory role of sympathetic nervous system in Ca²⁺-dependent proteolysis. **Braz J Med Biol Res.** 42: 21-28. 2009.

NAVEGANTES LCC, RESANO NZ, BAVIERA AM, MIGLIORINI RH AND KETTELHUT IC. Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 286: E642-E647. 2004.

NAVEGANTES LCC, MIGLIORINI RH, KETTELHUT IC. Adrenergic control of protein metabolism in skeletal muscle. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** 5 (3): 281-6. 2002.

NAVEGANTES LCC, RESANO NMZ, MIGLIORINI RH, KETTELHUT IC. Catecholamines inhibit Ca²⁺-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through β 2-adrenoceptors and AMPc. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 281(3): E449-E454. 2001.

NAVEGANTES LCC , RESANO NMZ, MIGLIORINI RH , KETTELHUT IC. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. **Am J Physiol. Endocrinol Metab.** 279: E663-E668. 2000.

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(5): 1399-1407. 1984.

NIETO FJ, YOUNG TB, LIND BK, SHAHAR E, SAMET JM, REDLINE S, D'AGOSTINO RB, NEWMAN AB, LEBOWITZ MD AND PICKERING TG. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. **JAMA.** 283: 1829–1836. 2000.

NIKLASSON M, HOLMÄNG A, SJÖSTRAND M, STRINDBERG L, LÖNNROTH P. Muscle glucose uptake is effectively activated by ischemia in type 2 diabetes subjects. **Diabetes.** 49: 1178-1185. 2000.

OTANI K, POLONSKY KS, HOLLOSZY JO, AND HAN DH. Inhibition of calpain results in impaired contraction-stimulated GLUT4 translocation in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 291: E544–E548. 2006.

OTANI K, HAN DH, FORD EL, GARCIA-ROVES PM, YE H, HORIKAWA Y, BELL GI, HOLLOSZY JO, POLONSKY KS. Calpain System Regulates Muscle Mass and Glucose Transporter GLUT4 Turnover. **J Biol Chem.** 279(20): 20915-20. 2004.

OTTENHEIJM CAC, HEUNKS LMA, GERAEDTS MCP AND DEKHUIJZEN PNR. Hypoxia-induced skeletal muscle fiber dysfunction: role for reactive nitrogen species. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 290: L127-L135. 2005.

PALMA S, RIPAMONTI M, VIGANO A, MORIGGI M, CAPITANIO D, SAMAJA M, MILANO G, CERRETELLI P, WAIT R AND GELFI C. Metabolic modulation induced by chronic hypoxia in rats using a comparative proteomic analysis of skeletal muscle tissue. **J Prot Res.** 6: 1974-1984. 2006.

PARR T, SENSKY PL, ARNOLD MK, BARDSLEY RG BUTTERY PJ. Calpastatin expression in porcine cardiac and skeletal muscle and partial gene structure. **Arch. Biochem. Biophys.**, 395(1): 1-13. 2001.

PARRA O, ARBOIX A, BECHICH S. Time course of sleep related breathing disorders in first-ever stroke or transient ischemic attack. **Am J Respir Crit Care Med.** 161: 375–380. 2000.

PEPPARD PE, YOUNG T, PALTA M, DEMPSEY J AND SKATRUD J. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. **JAMA: J Amer Med Assoc.** 284 (23): 3015-3021. 2000.

PREEDY VR AND SUGDEN PH. The effects of fasting or hypoxia on rates of protein synthesis *in vivo* in subcellular fractions of rat heart and gastrocnemius muscle. **Biochem J.** 257: 519-527. 1989.

POLOTSKY VY, LI J, PUNJABI NM, RUBIN AE, SMITH PL, SCHWARTZ AR, O'DONNELL CP. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. **J Physiol.** 552(1): 253–264. 2003.

PONTREMOLI S, VIOTTI PL, MICHETTI M, SALAMINO F, SPARATORE B, MELLONI E. Modulation of inhibitory efficiency of rat skeletal muscle calpastatin by phosphorylation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 187(2): 751-759. 1992.

ROWELL LB, JOHNSON DG, CHASE PB, COMESS KA, SEALS DR. Hypoxemia raises muscle sympathetic activity but not norepinephrine in resting humans. **J Appl Physiol.** 66(4): 1736-43.1989.

SAGGERSON ED AND ALAM N. Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in *soleus* muscle. **Biochem. J.** 334: 233-241. 1998.

SAGGERSON ED AND AWAN MM. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation . **Biochem. J.** 295: 61-66. 1993.

SAIDO HC, SORIMACHI H, AND SUZUKI K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. **FASEB J.** 8(11): 814-22. 1994.

SAULEDA J, GARCÍA-PALMER F, WIESNER RJ, TARRAGA S, HARTING I, TOMÁS P, GÓMEZ C, SAUS C, PALOU A, AGUSTÍ AGN. Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med.** 157:1413–1417. 1998.

SAVRANSKY V, NANAYAKKARA A, VIVERO A, LI J, BEVANS S, SMITH PL, TORBENSON MS, POLOTSKY VY. Chronic Intermittent Hypoxia Predisposes to Liver Injury. **Hepatology.** 45(4):1007-13. 2007.

SEMENZA GL. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. **Physiol.** 24: 97–106. 2008.

SEMENZA, GL. Perspectives on oxygen sensing. **Cell** 98: 281–284. 1999.

SENSKY PL, JEWELL KK, RYAN KJ, PARR T, BARDSLEY RG, BUTTERY PJ. Effect of anabolic agents on calpastatin promoters in porcine skeletal muscle and their responsiveness to cyclic adenosine monophosphate- and calcium-related stimuli. **J Anim Sci.** 84(11): 2973-2982. 2006.

SHAHAR E, WHITNEY CW, REDLINE S, LEE ET, NEWMAN AB, JAVIER NIETO F, O'CONNOR GT, BOLAND LL, SCHWARTZ JE AND SAMET JM. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 163: 19–25. 2001.

SHAMOON H, JACOB R, SHERWIN RS. Epinephrine-induced hypoaminoacidemia in normal and diabetic human subjects. Effect of beta blockade. **Diabetes.** 29: 875-881. 1980.

SHEARER J, FUEGER PT, ROTTMAN JN, BRACY DP, BINAS B, WASSERMAN DH. Heart-type fatty acid-binding protein reciprocally regulates glucose and fatty acid utilization during exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 288: E292–E297. 2005.

SHEARER J, FUEGER PT, VORNDICK B, BRACY DP, ROTTMAN JN, CLANTON JA, WASSERMAN DH. AMP kinase-induced skeletal muscle glucose but not long-chain fatty acid uptake is dependent on nitric oxide. **Diabetes.** 53: 1429–1435. 2004.

SICA AL, GREENBERG HE, RUGGIERO DA, SCHARF V. Chronic-intermittent hypoxia: a model of sympathetic activation in the rat. **Respiration Physiology**. 121: 173–184. 2000.

SILVERMAN HS, WEI S, HAIGNEY MC, OCAMPO CJ, STERN MD. Myocyte adaptation to chronic hypoxia and development of tolerance to subsequent acute severe hypoxia. **Circ Res**. 80(5): 699-707. 1997.

SJÖRGREN B, NOERDENSKLÖLD T, HOLMGEEN H, MOLLERSTRÖM J. Beitrag zur Kenntnis der Leberhythmik (glycogen, Phosphor und calcium in der Kaninchenleber). **Pfügers Arch Ges Physiol**. 240: 247-436. 1938.

SRERE, PA. Citrate synthase. **Methods Enzymology**. 1: 33-11. 1969.

STEINBERG GR AND KEMP BE. AMPK in Health and Disease. **Physiol Rev**. 89: 1025–1078. 2009.

STEINBERG GR, SMITH AC, VAN DENDEREN BJW, CHEN Z, MURTHY S, CAMPBELL DJ, HEIGENHAUSER GJF, DYCK DJ, KEMP BE. AMP activated protein kinase is not down-regulated in human skeletal muscle of obese females. **J Clin Endocrinol Metab**. 89: 4575–4580.2004.

SULLIVAN JE, BROCKLEHURST KJ, MARLEY AE, CAREY F, CARLING D. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. **FEBS Lett.** 353(1): 33-6. 1994.

TAKANO E, MAKI M. Calpains: pharmacology and toxicology of calcium-dependent protease. **Philadelphia, PA. Taylor & Francis**, 1999, cap. 2, p. 25-50.

TIDBALL JG AND SPENCER MJ. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. **J. Physiol.** 545: 819-828. 2002.

THOMSON DM AND WINDER WW. AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. **Acta Physiol.** 196: 147–154. 2009.

TOWBIN H, STAEGELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **PNAS.** 76: 4350-4354. 1979.

VOLGIN DV AND KUBIN L. Chronic intermittent hypoxia alters hypothalamic transcription of genes involved in metabolic regulation. **Auton Neur: Bas Clin.** 126-127: 93-99. 2006.

XI X, HAN J, AND ZHANG JZ. Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. **J Biol Chem.** 276 (44): 41029–41034. 2001.

XIA Y, WARSHAW JB AND HADDAD GG. Effect of chronic hypoxia on glucose transporters in heart and skeletal muscle of immature and adult rats. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.** 273: 1734-1741. 1997.

XIE HQ, CHOI RC, LEUNG KW, SIOW NL, KONG LW, LAU FT, PENG HB, TSIM KW. Regulation of a transcript encoding the proline-rich membrane anchor of globular muscle acetylcholinesterase. The suppressive roles of myogenesis and innervating nerves. **J Biol Chem.** 282(16): 11765-75. 2007.

WAALKES TP AND UDENFRIEND S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. **J Lab Clin Med.** 50 (5): 733-6. 1957.

WANG S, HU Z, HU J, DU J, AND MITCH WE. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. **Endocrinology.** 147(9): 4160–4168. 2006.

WEST JB. **In: Fisiologia Respiratória Moderna.** . 5ª edição. Rio de Janeiro. Editora Manole Ltda.1996.

WILLIAMS AB, DECOURTEN-MYERS GM, FISCHER JE, LUO G, SUN X, HASSELGREN PO. Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. **FASEB J.** 13: 1435–1443. 1999.

WINDER WW AND HOLMES BF. Insulin stimulation of glucose uptake fails to decrease palmitate oxidation in muscle if AMPK is activated. **J Appl Physiol.** 89: 2430–2437. 2000.

WING SS, CHIANG HL, GOLDBERG AL and DICE JF. Proteins containing peptide sequences related to Lys-Phe-Glu-Arg-Gln are selectively depleted in liver and heart, but not skeletal muscle, of fasted rats. **Biochem. J.** 275: 165-169. 1991.

WRIGHT DC, GEIGER PC, HOLLOSZY JO, HAN DH. Contraction- and hypoxia-stimulated glucose transport is mediated by a Ca²⁺-dependent mechanism in slow-twitch rat *soleus* muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 288: E1062–E1066. 2005.

ZIERATH JR AND LONG YC. Influence of AMP-activated protein kinase and calcineurin on metabolic networks in skeletal muscle. **Am J Endocrinol Metab.** 295: E545-E552. 2008.

ZOCCAL DB, PATON JFR, MACHADO BH. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 2009.

ZOCCAL DB, SIMMS AE, BONAGAMBA LGH, BRAGA VA, PICKERING AE, PATON JFR, MACHADO BH. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. **J Physiol.** 586.13: 3253–3265. 2008.

ZOCCAL DB, BONAGAMBA LGH, OLIVEIRA FRT, ANTUNES-RODRIGUES J, MACHADO BH. Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. **Exp Physiol.** 92.1: 79–85. 2007.

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](#)