

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

FLÁVIA APARECIDA GRAÇA

**A ação fisiológica da adrenalina na
regulação do metabolismo de proteínas
musculares no jejum**

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FLÁVIA APARECIDA GRAÇA

**A ação fisiológica da adrenalina na
regulação do metabolismo de proteínas
musculares no jejum**

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
2010**

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

Graça, Flávia Aparecida

A ação fisiológica da adrenalina na regulação do metabolismo de proteínas musculares no jejum/Flávia Aparecida Graça; orientador Luiz Carlos Carvalho Navegantes. – Ribeirão Preto, 2010.

75f. 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. Adrenalina. 2. Músculo esquelético. 3. Jejum. 4. Sistemas proteolíticos. 5. Síntese protéica.

*Saber o que todos sabem é nada saber,
o saber começa onde começa o que o mundo ignora.
A verdadeira ciência está situada além da chamada ciência.”*

Rémy de Gourmont

Dedicatória

À minha família

Ao meu pai Carlos, que tão cedo se foi, mas deixou comigo lembranças e momentos dos quais jamais esquecerei. Com seu jeito menino aprendi o quanto é simples viver. Sinto muitas saudades!

À minha mãe Sônia, amiga e confidente que acompanhou cada passo da minha vida vivenciando todas as emoções, que foi rígida nos momentos que tinha que ser e que me apoiou na hora em que mais precisava. Obrigada por fazer dos meus sonhos os seus!

À minha irmã Carla, que foi a peça fundamental na realização desse sonho, com seu enorme coração me proporcionou a segurança que eu precisava.

Ao meu irmão César, homem forte e batalhador, em quem me espelhei para enfrentar uma das fases mais difíceis da minha vida, a separação.

À minha tia Paula, pelo apoio, paciência e dedicação. Obrigada por fazer parte desta família!

Ao meu cunhado e irmão Denelson, por ser essa pessoa iluminada, alegre e tão querida.

Ao meu namorado Gianni, um exemplo de determinação, pelo apoio incondicional, paciência e por compreender as muitas horas de ausência durante a realização deste trabalho. Obrigada por fazer parte da minha vida!

A vocês devo o que sou! Amo muito vocês!

Agradecimentos Especiais

A Deus todo misericordioso, pela infinita bondade e por me permitir conviver com pessoas maravilhosos que só acrescentaram em minha vida. E aos espíritos superiores que nas horas decisivas me guiaram a trilhar o caminho certo.

Ao meu orientador Prof. Luiz C. C. Navegantes, pela oportunidade de trilhar os seus passos, confiança, dedicação extrema e por fazer jus ao nome “orientador”. Ao meu pai científico Luiz C. C. Navegantes por me ensinar a dar os meus primeiros passos na carreira científica que foram decisivos para minha formação. Muito obrigada por acreditar em mim!

A Profa. Dra. Ísis do Carmo Kettelhut cuja orientação foi essencial durante o meu mestrado. Sua história de vida sempre foi um exemplo para mim. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Renato Hélio Migliorini (in memoriam), pelos fortes alicerces construídos durante longos anos e pelos valiosos ensinamentos.

A Profa. Dra. Elza Maria Castilho, pela ajuda e orientação indispensáveis durante a aula da minha qualificação; e a Profa. Cleuzenir Toschi Gomes, pela atenção dispensada e pela oportunidade de cursar o curso de aperfeiçoamento em Fisiologia Humana da Faculdade de Medicina de Rio Preto.

A Profa. Dra. Orfa Yineth Galvis-Alonso, pelos ensinamentos científicos valiosos na área de Neurofisiologia e pelo apoio dispensado.

A Neusa Maria Zanon, pelo auxílio técnico indispensável, sem o qual eu não teria finalizado este trabalho, e pelos importantes ensinamentos técnicos.

A Elza Aparecida Filippin, pelas agradáveis conversas futebolísticas durante a pausa para o café e pela valiosa ajuda durante os experimentos.

A Maria Antonieta Rissato Garófalo, pela ajuda essencial nas dosagens de catecolaminas e pelas agradáveis horas de conversas durante o café.

Ao Leandro Garcia, pelo auxílio técnico e pelas conversas e discussões sempre prazerosas.

Ao Victor Diaz Galban, pelos valiosos auxílios computacionais e a Amanda Araújo, pela agradável convivência.

A Andreza Bonifácio, Michael Douglas de Oliveira e Hugo pela organização e eficiência em seus respectivos trabalhos facilitando a cada dia o andamento dos experimentos.

Agradecimentos especiais

Aos meus amigos-irmãos Eduardo Carvalho Lira e Dawit A. P. Gonçalves que desde 2005 estão comigo nesta viagem onde aprendemos e crescemos muito um com o outro. Obrigada pelo apoio sempre incondicional e pelos ensinamentos que levarei para o resto da vida. Se não fosse pela amizade de vocês eu não sei se eu teria conseguido chegar até aqui.

Ao grande amigo Wilian A. Silveira, pelo companheirismo, ajuda, opiniões e caronas sempre vindas na hora certa. Muito obrigada pelo apoio.

As amigas e companheiras Sílvia de Paula Gomes e Luciana Carvalho, por me darem abrigo logo quando eu cheguei a Ribeirão Preto e por serem pessoas maravilhosas das quais nunca esquecerei. Muito obrigada pela força!

A Priscila Cassolla e Lidiany Góis, pelas horas divertidas que passamos juntas durante as cirurgias estereotáxicas.

Aos amigos do laboratório do Controle do Metabolismo: Danúbia Frasson, Valéria Ernestânia, Amanda Martins Baviera, Graziela Nascimento, Francielle Przygodda, Rafael R. Valentim, Leandro Manfredi e Tiago de Lorena Fábio, por tornarem os meus dias de trabalho no laboratório agradáveis e divertidos.

Aos amigos do cursão da Fisiologia Plínio, Pedro, Tiago, Tiago “Rod”, Adriano, Gabriela, Luana, Tatiane, Elaine, Juliana e Bruna pelos momentos agradáveis que passamos juntos e pelas discussões prazerosas durante os estudos.

As amigas Patrícia C. B. Caldeira e Zélia Cristina Régis, pelos maravilhosos momentos que passamos na Biblioteca.

A amiga Heloisa Cristina Caldas, pelas conversas sempre agradáveis e momentos inesquecíveis.

A biomédica Glória Elisa pelos ensinamentos durante o início da minha carreira como técnica de laboratório, ensinamentos esses que foram valiosos para minha formação. E a amiga Glória Elisa pelos conselhos, pelas horas agradáveis que passamos juntas na FAMERP. Muito obrigada por fazer parte desta história!

A amiga sempre presente Camila Crovador, pelo companheirismo e por me ouvir sempre com muita atenção. Obrigada!

As amigas-irmãs Eulália e Larissa, por tornarem os meus dias em Ribeirão Preto mais leves e prazerosos. Muito obrigada, vocês são muito especiais!

Agradecimentos especiais

À minha Tia Esmeralda e toda sua família que tornaram os meus finais de semana em Ribeirão Preto muito mais divertidos. Obrigada pelo apoio!

Aos pós-graduandos da Bioquímica Patrícia, Andréia, Rosana e Lucas, pela simpatia e pelos momentos agradáveis.

Aos bioteristas, Eduardo e Leonardo, por serem sempre atenciosos, solícitos e cuidadosos com os animais.

Aos funcionários do departamento de Fisiologia Elisa, Claudia, Fernando e Carlos, pela atenção dispensada.

A todos os pós-graduandos e funcionários do departamento de Fisiologia, pelas horas agradáveis de conversa durante os corridos intervalos entre os experimentos.

A todos os meus ex-colegas de trabalho da FAMERP, onde passei momentos inesquecíveis. Obrigada pelo apoio e profissionalismo!

Ao suporte financeiro da FAPESP e CAPES.

Resumo

GRAÇA, F. A. O papel fisiológico da adrenalina no metabolismo de proteínas musculares no jejum. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Embora já esteja bem estabelecido que o Sistema Nervoso Simpático exerça efeitos anabólicos no metabolismo de proteínas musculares em condições basais, seu papel fisiológico no *turnover* de proteínas em situações de demanda energética ainda é desconhecido. Assim, o presente trabalho teve como objetivo principal investigar o efeito da adrenodemedulação (após 10 dias da remoção cirúrgica da medula adrenal) no catabolismo protéico muscular induzido pelo jejum de 2 dias em ratos. Foram utilizados ratos machos Wistar, adultos (~230g) e jovens (~80g), os quais foram divididos em quatro grupos: (1) Sham alimentado, (2) Sham jejuado por 48h, (3) Adrenodemedulado (ADMX) alimentado e (4) ADMX jejuado por 48h.

A eficácia da desnervação foi comprovada por meio da dosagem das catecolaminas plasmáticas por HPLC. O jejum não alterou as concentrações das catecolaminas circulantes, entretanto, a adrenodemedulação praticamente aboliu as concentrações de adrenalina e reduziu em 60% as de noradrenalina no plasma de animais alimentados e jejuados, sem alterar as concentrações plasmáticas de corticosterona. O metabolismo de proteínas *in vivo* foi monitorado indiretamente pela determinação da concentração intersticial de tirosina no músculo tibial anterior de ratos adultos pela microdiálise. A redução das catecolaminas circulantes aumentou o catabolismo protéico em músculos de ratos jejuados, sendo este aumento proveniente de uma maior liberação local de tirosina sem alteração arterial do aminoácido ou do fluxo sanguíneo muscular. Em seguida, músculos *soleus* e EDL de ratos jovens foram utilizados para os experimentos *in vitro*, onde se investigou a velocidade de

síntese protéica, a degradação total de proteínas assim como as atividades dos diferentes sistemas proteolíticos e expressão dos atrogenes (genes relacionados com atrofia e autofagia). Como esperado, o jejum reduziu a síntese protéica em músculos de animais *Sham* e ADMX de forma semelhante. No entanto, a depleção da adrenalina em animais alimentados aumentou a velocidade de incorporação da tirosina marcada com ^{14}C em proteínas nos músculos EDL e *soleus*, sugerindo um aumento do *turnover* de noradrenalina muscular ou uma hipersensibilização à ação da insulina. A degradação total de proteínas musculares no músculo EDL foi extremamente aumentada no grupo ADMX jejum quando comparado ao grupo jejum. Entretanto, a degradação protéica em músculos *soleus* não foi alterada pelo jejum ou pela ADMX. O aumento adicional de proteólise total observado no músculo EDL de ratos jejuados induzido pela ADMX foi associado a uma hiperativação dos sistemas lisossomal e dependente de Ub-proteassoma. Em paralelo, observou-se um aumento da expressão gênica das E3 ligases (atrogina-1 e MurF1) e dos genes autofágicos (LC3 e GABARAP) no jejum, sendo esse aumento exacerbado com a depleção da adrenalina plasmática. Verificou-se também uma redução da fosforilação da Akt em músculos esquelético de ratos ADMX jejuados em relação ao grupo jejuado.

Os dados do presente estudo nos permitem concluir que a depleção das catecolaminas plasmáticas, principalmente a adrenalina, amplifica os efeitos catabólicos induzidos pelo jejum na ativação dos sistemas proteolíticos (lisossomal e Ub-proteassoma) e na expressão dos atrogenes em músculos EDL de ratos, sendo este efeito provavelmente devido à redução da fosforilação da Akt. Portanto, a secreção da adrenalina plasmática parece ter um importante papel protetor na perda de proteínas musculares durante o jejum.

Palavras-chave: Adrenalina. Músculo esquelético. Jejum. Sistemas proteolíticos. Síntese protéica.

Abstract

GRAÇA, F. A. Physiological role of epinephrine in the regulation of muscle protein metabolism during fasting. 2010. 75 p. Dissertation (Master degree) School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Although it is well established that the Sympathetic Nervous System exerts anabolic effects on skeletal muscle protein metabolism in basal conditions, its physiological role on muscle protein *turnover* in catabolic situations is still unclear. Thus, the goal of the present work was to investigate the effect of adrenalectomy (10 days after the surgical removal of adrenal medulla) on muscle protein catabolism induced by food deprivation for 2 days in rats. Male Wistar adults (~230g) and young (~80g) rats were divided in 4 groups: (1) fed Sham; (2) fasted Sham; (3) fed adrenalectomized (ADMX); and (4) fasted ADMX.

Denervation efficacy was assessed by plasma catecholamines measurements. Fasting did not alter plasma catecholamines concentrations either in Sham or ADMX rats. Adrenalectomy almost abolished the plasma epinephrine concentration in both fed and fasted animals, without affecting plasma corticosterone levels. The *in vivo* protein metabolism was monitored indirectly by measurements of tyrosine concentration in *tibialis anterior* muscle from adult rats by microdialysis. Reduction of circulating epinephrine in fasted rats increased interstitial-arterial tyrosine concentration difference but did not alter muscle blood flow suggesting an increase in muscle protein catabolism. *Soleus* and EDL muscles of young rats were used to investigate *in vitro* the overall proteolysis and protein synthesis (evaluated by rate of incorporation [¹⁴C]-tyrosine) as well as the activity of the proteolytic systems and the expression of atrogenes (genes related to atrophy and autophagy). As expected, fasting similarly reduced muscle protein synthesis in Sham and ADMX group. On the other hand,

epinephrine depletion in fed animals increased the rate of incorporation of [^{14}C] tyrosine into proteins in both *soleus* and EDL muscles, suggesting an increase in the rate of muscle norepinephrine *turnover* and/or a hypersensitivity to the anabolic effects of insulin on protein synthesis. Total degradation of muscle proteins in EDL muscle was increased in fasted ADMX group compared to fasted Sham group. Interestingly, protein degradation in *soleus* muscle was not altered either by fasting or ADMX. The additional increase of overall proteolysis induced by ADMX in EDL muscle of fasted rats was associated with hyperactivity of lysosomal and Ub- proteasome-dependent proteolytic systems. In parallel, we observed an increase in the mRNA expression of E3 ligases (atrogen-1 and MuRF1) and autophagic genes (LC3 and GABARAP) during fasting, which was even higher by depletion of plasma epinephrine. We also verified a reduction of Akt phosphorylation in skeletal muscle of fasted ADMX rats compared to fasted Sham group.

The data suggest that depletion of plasma catecholamines, mainly epinephrine, amplifies the catabolic effects induced by fasting increasing the activity of proteolytic systems (lysosomal and Ub-proteasome) and the atrogenes expression in EDL muscles from rats, being these effects probably due to a decreased Akt phosphorylation. Therefore, circulating epinephrine seems to restrain muscle protein breakdown during food deprivation.

Key-words: Epinephrine. Skeletal muscle. Fasting. Proteolytic systems. Protein synthesis.

LISTA DE SIGLAS

AC	Adenilato Ciclase
Ác.	Ácido
AGL	Ácidos graxos livres
Akt	Proteína quinase B
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
Atg	Genes relacionados à autofagia
ATP	Adenosina trifosfato
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada
CB	Clembuterol
CRE	Elemento responsivo ao AMPc
CREB	Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
DTT	Ditiotreitol
E1	Enzima ativadora de Ub
E2	Enzima carreadora de Ub
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
eIF3-f	Subunidade f do fator de iniciação da tradução 3
EPM	Erro padrão da média
EPAC	Exchange protein directly activated by cAMP

Foxo	Forkhead box class o
GABARAP	γ -aminobutyric acid receptor-associated protein
GATE-16	Golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa
GH	Hormônio do crescimento
GSK3- β	Glicogênio sintase quinase 3- β
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina – I
KOH	Hidróxido de potássio
LC3	microtubule-associated protein light chain 3
LHS	Lipase hormônio-sensível
Met- RNAt _i ^{Met}	RNA transportador iniciador ligado a um resíduo de metionina
MG132	N-carboxibenzoxi-Leu-Leu-Leucinal
mTOR	Proteína alvo da rapamicina de mamíferos
MuRF-1	Muscle RING (Really Interisting New Gene) Finger – 1
NC	Nitrocelulose
NTS	Núcleo do trato solitário
PGPH	Hidrolisante de peptidil-glutamil-peptídeos
PHAS-1/4E-BP1	Proteína ligante do eIF4E
PI3K	Fosfaditilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNAt _i	RNA transportador iniciador
S6K1/p70 ^{S6K}	Proteína quinase S6 da subunidade ribossomal de 70kDa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
Ub	Ubiquitina

SUMÁRIO

1.0.	<i>Introdução</i>	1
	<i>Controle da proteólise muscular</i>	4
	<i>O papel central da Akt na sinalização do metabolism protéico</i>	9
	<i>Ações anabólicas da adrenalina no metabolismo de proteínas</i>	10
2.0.	<i>Objetivos</i>	12
3.0.	<i>Materiais e métodos</i>	13
3.1.	<i>Animais</i>	13
3.2.	<i>Modelo experimental</i>	14
	3.2.1. <i>Adrenodemedulação</i>	14
	3.2.2. <i>Grupos experimentais</i>	15
3.3.	<i>Estudo do metabolismo de proteínas pela microdiálise</i>	15
	3.3.1. <i>Microdiálise: procedimento geral</i>	15
	3.3.2. <i>Fator de recuperação (“recovery”) dos cateteres</i>	17
	3.3.3. <i>Cálculos para determinação da concentração intersticial de tirosina</i>	17
	3.3.4. <i>Protocolo experimental</i>	18
3.4.	<i>Determinação dos parâmetros hemodinâmicos</i>	19
	3.4.1. <i>Pressão Arterial Média (PAM)</i>	19
	3.4.2. <i>Quantificação do Fluxo Sanguíneo Muscular(FSM)</i>	20
3.5.	<i>Catecolaminas Plasmáticas</i>	21
3.6.	<i>Procedimento experimental para o estudo da proteólise em músculos esqueléticos de ratos</i>	21
	3.6.1. <i>Avaliação da atividade proteolítica</i>	22
	3.6.2. <i>Procedimentos experimentais para a avaliação dos sistemas proteolíticos</i>	23
	A. <i>Lisossomal</i>	23
	B. <i>Sistema dependente de Cálcio</i>	25
	C. <i>Sistema dependente de ubiquitina-proteassoma</i>	26
3.7.	<i>Procedimento experimental para a avaliação da síntese total de proteínas em músculos esqueléticos de ratos</i>	27

3.8.	<i>Avaliação da expressão gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR).....</i>	29
	a) <i>Extração de RNA.....</i>	29
	b) <i>Quantificação das amostras de RNA.....</i>	30
	c) <i>Produção de cDNA – Transcrição Reversa (RT).....</i>	30
	d) <i>PCR em tempo real.....</i>	31
3.9.	<i>Western Blot.....</i>	32
3.10.	<i>Análises bioquímicas.....</i>	33
3.11.	<i>Determinação do glicogênio hepático e muscular.....</i>	34
3.12.	<i>Análise estatística.....</i>	34
4.0.	<i>Resultados.....</i>	35
4.1.	<i>Caracterização do modelo experimental.....</i>	35
	4.1.1. <i>Efeito ADMX na massa corporal.....</i>	35
	4.1.2. <i>Efeito da ADMX nas concentrações das catecolaminas plasmáticas.....</i>	36
	4.1.3. <i>Efeito da ADMX em diferentes parâmetros hormonais, metabólicos e massa do tecido adiposo e muscular</i>	37
4.2.	<i>Efeito in vivo da ADMX na pressão arterial média, fluxo sanguíneo muscular e no metabolismo de proteínas musculares em animais adultos alimentados e jejuados.....</i>	40
	4.2.1. <i>Alterações hemodinâmicas.....</i>	40
	4.2.2. <i>Concentrações intersticial (I), arterial (A) e diferença I-A de tirosina muscular.....</i>	42
4.3.	<i>Efeito da ADMX no metabolismo de proteínas em músculos isolados de animais jovens alimentados e jejuados.....</i>	43
	4.3.1. <i>Síntese protéica.....</i>	44
	4.3.2. <i>Proteólise Total.....</i>	45
	4.3.2. <i>Atividades dos sistemas proteolíticos.....</i>	46
	A.1. <i>Sistema dependente de Ubiquitina-Proteassoma.....</i>	46
	A.2. <i>Sistema Lisossomal.....</i>	47
	A.3. <i>Sistema dependente de Cálcio.....</i>	48
	4.3.3. <i>Expressão dos atrogenes.....</i>	49
	4.3.4. <i>Efeito da ADMX na fosforilação da Akt no músculo esquelético.....</i>	51

5.0.	<i>Discussão</i>	53
5.1.	<i>Efeito in vivo da ADMX no metabolismo de proteínas musculares</i>	57
5.2.	<i>Efeito da ADMX na síntese de proteínas musculares</i>	59
5.3.	<i>Efeito da ADMX na degradação de proteínas musculares</i>	60
6.0.	<i>Referências Bibliográficas</i>	67

1.0. Introdução

O Sistema Simpatoadrenal ou Sistema Nervoso Simpático (SNS) é uma unidade funcional integrada formada pelas terminações nervosas simpáticas e pela porção medular da glândula adrenal (HUBER et al., 2009). Os neurônios pré-ganglionares simpáticos têm seus corpos celulares localizados na coluna intermédio-lateral da medula espinal. Seus axônios (fibras pré-ganglionares) saem pelas raízes ventrais da medula e seguem até os gânglios para e pré-vertebrais. Destes gânglios originam-se as fibras pós-ganglionares, cujos terminais inervam os diferentes órgãos e tecidos periféricos liberando diretamente noradrenalina na fenda sináptica.

A glândula adrenal está localizada acima do rim e é composta pela porção cortical e medular. O córtex adrenal sintetiza e secreta diferentes hormônios como os mineralocorticóides e glicocorticóides que possuem ação fundamental no controle do metabolismo intermediário e do balanço hidroeletrolítico. A porção medular é formada pelas células cromafins, as quais são inervadas diretamente por fibras simpáticas pré-ganglionares. Estas células sintetizam e secretam as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), sendo o principal produto de secreção (85%) constituído pela adrenalina (HUBER et al., 2009).

A contribuição relativa dos componentes neural e hormonal do simpático, a qual pode ser estimada pela determinação das concentrações plasmáticas das catecolaminas, dependerá do contexto e do tipo de estímulo (ROATTA & FARINA, 2010). Durante a exposição ao frio, por exemplo, a resposta inicial é predominantemente devido à estimulação da inervação simpática direta dos tecidos, mas com a severidade do estímulo, a secreção das catecolaminas pela medula da adrenal aumenta progressivamente (LEDUC, 1961; YOUNG & LANDSBERG, 1983). Um aspecto interessante da regulação dos dois componentes do sistema simpatoadrenal é a capacidade de um deles compensar a ausência ou falta do outro.

Takahashi et al. (1993) demonstraram que após a remoção bilateral da medula das glândulas adrenais (adrenodemedulação) de ratos ocorre um aumento do *turnover* de noradrenalina no pâncreas, coração e no tecido adiposo marrom, enquanto que na simpatectomia química (bloqueio farmacológico das terminações simpáticas) o *turnover* de adrenalina na medula adrenal era bastante acelerado. Portanto, existe um controle compensatório entre os dois ramos do simpático no sentido de manter a homeostase corporal.

As catecolaminas exercem seus efeitos biológicos por meio da ativação de receptores adrenérgicos (adrenoceptores) localizados na membrana celular, que são de dois tipos (alfa e beta) e diferentes sub-tipos (GILSBACH & HEIN, 2008). Adrenalina e noradrenalina podem se ligar ao mesmo adrenoceptor, mas com diferentes afinidades, por exemplo, é muito bem conhecido que a adrenalina possui uma afinidade de ligação ao adrenoceptor beta-2 várias vezes superior à da noradrenalina. Este é o principal sub-tipo de adrenoceptor localizado no sarcolema do músculo esquelético, cuja densidade varia de acordo com o tipo de fibra muscular. Sabe-se que músculos ricos em fibras do tipo I, de metabolismo oxidativo, como o *soleus* possui uma densidade de adrenoceptores beta-2 duas a três vezes superior a de músculos tipicamente glicolíticos, ricos em fibras do tipo II, como o EDL (MARTINEAU et al., 1993; RYALL et al., 2002; 2004). Apesar desta diferença, músculos glicolíticos, por razões desconhecidas, respondem mais eficientemente aos efeitos da adrenalina (RYALL et al., 2004; 2006). Além de promover vasodilatação muscular, a ativação adrenérgica dos adrenoceptores beta-2 resulta em uma série de efeitos mediados diretamente na fibra muscular.

A adrenalina, ao se ligar aos receptores adrenérgicos do sub-tipo beta-2, os quais estão acoplados à proteína G estimulatória (Gs), promove a troca do GDP por GTP, levando à dissociação das subunidades alfa de beta-gama. Ficando alfa ligada ao GTP, esta pode interagir e ativar a adenilato ciclase, enzima responsável pela síntese do AMPc a partir do

ATP. Este segundo mensageiro é responsável pela ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA), desencadeando uma diversidade de efeitos biológicos. Estudos recentes têm mostrado uma nova via de sinalização adrenérgica que parece ser independente da PKA. A Rap1, uma pequena GTPase, que apresenta domínios trocadores do nucleotídeo guanina (GEFs) regulados diretamente por segundos mensageiros como o cálcio, diacilglicerol (BOS et al., 2001). Curiosamente, De Rooij et al (1998) mostraram que o aumento do AMPc em células tratadas com forskolin também aumenta a atividade da Rap1, independentemente de PKA. Este fato motivou o estudo de identificação de proteínas com seqüências GEF homólogas para Ras e Rap e sítios de ligação ao AMPc. Estes autores identificaram o gene que codifica esta proteína e a denominaram de Epac. A Epac regula processos celulares importantes como transiente de cálcio, proliferação, diferenciação, expressão gênica, apoptose, transporte de íons, adesão celular e sinalização neural (CHENG et al., 2008; ROSCIONI et al., 2008; BORLAND et al., 2009).

Mei et al. (2002) demonstraram em células HEK 293 que o aumento do conteúdo de AMPc, promovidos pela forskolin, desencadeou mecanismos que ativaram a Epac que levou à fosforilação da Akt via PI3K. Recentes estudos de nosso laboratório (BAVIERA et al., 2009) têm demonstrado que a adrenalina ou agonistas adrenérgicos beta-2, por meio da ativação da Epac, potencializa as ações anabólicas da insulina na fosforilação da Akt em músculo *soleus*, sugerindo que as catecolaminas estimulam a fosforilação da Akt via AMPc/ Epac/ PI3K. Entretanto, novos estudos são necessários para esclarecer a interação dos mediadores da via de sinalização intracelular da insulina e das catecolaminas.

No jejum, a atividade do sistema nervoso simpático é reduzida em tecidos específicos de animais (YOUNG & LANDSBERG, 1977, 1979; RAPPAPORT et al., 1982) e humanos (YOUNG, 1984; JUNG et al., 1979; SOWERS et al., 1982), como o tecido adiposo marrom e o coração. Este ajuste homeostático é importante para a diminuição da taxa metabólica frente

à restrição calórica. O oposto parece acontecer com os hormônios liberados pela medula adrenal em humanos sob privação alimentar. Nessa situação, ocorre um aumento da secreção das catecolaminas plasmáticas, principalmente a adrenalina, cuja função metabólica é ativar glicogenólise, a neoglicogênese e a lipólise. Essas ações são importantes para o fornecimento de glicose para tecidos que utilizam como fonte energética exclusivamente esta hexose (como o SNC), e também para a maior disponibilidade de ácidos graxos e glicerol no plasma, os quais podem ser utilizados como substratos energéticos alternativos e como fonte de carbonos para a neoglicogênese, respectivamente. Esses efeitos catabólicos no metabolismo de carboidratos e lipídios são exercidos diretamente pela ativação de adrenoceptores presentes em órgãos e tecidos como o fígado, músculo e tecido adiposo e são reforçados indiretamente pelo antagonismo à ação e secreção da insulina. Uma importante resposta adaptativa do jejum é a mobilização de aminoácidos para suportar a energia necessária ao organismo. As alterações do metabolismo de proteínas no jejum ocorrem em duas fases. Na fase inicial, ocorre um aumento da liberação dos aminoácidos dos músculos esqueléticos, resultante da redução da síntese protéica e de um aumento acentuado na degradação de proteínas. Estas respostas adaptativas no metabolismo de proteínas musculares são sinalizadas pela redução dos níveis de insulina circulante e pelo aumento dos glicocorticóides. Durante o jejum prolongado, a quebra de proteínas musculares tanto em animais quanto em humanos é reduzida e pode até mesmo retornar a valores observados no estado alimentado (LI & GOLDBERG, 1976). Esse ajuste metabólico cujo controle ainda é muito pouco conhecido é fundamental para preservar proteínas e assim garantir a sobrevivência do indivíduo. Entre os fatores que parecem inibir a proteólise muscular durante esta fase pode-se citar os altos níveis de ácidos graxos livres (AGL) e de corpos cetônicos, assim como a redução dos hormônios tireoidianos (KETTELHUT, 1994). A **hipótese** a ser testada no presente trabalho é que a

adrenalina secretada pela medula adrenal possa vir a exercer um importante papel fisiológico na prevenção do catabolismo protéico muscular durante o jejum.

Controle da proteólise muscular

O controle da proteólise muscular é um tema de grande interesse na área da fisiologia devido a sua importância na regulação do crescimento e da diferenciação celular, nos processos de degradação das proteínas anormais, no fornecimento de aminoácidos para neoglicogênese, na regulação das concentrações enzimáticas e na apresentação de antígenos de superfície nas respostas imunes (JEFFERSON et al., 2001; KETTELHUT et al., 1988). Todas essas funções demonstram a importância da investigação da regulação do *turnover* de proteínas em situações fisiológicas e patológicas.

O músculo esquelético contém três principais sistemas proteolíticos: (a) o lisossomal que depende da atividade das diferentes isoformas das catepsinas; (b) o sistema proteolítico dependente de Cálcio que contém duas proteases importantes, a microcalpaína e a milicalpaína, e seu inibidor endógeno, a calpastatina (GOLL et al., 1991) e; (c) um sistema que é considerado de vital importância denominado de ubiquitina (Ub)-proteassoma dependente de ATP.

O *sistema lisossomal* representa uma das principais vias de degradação em células de mamíferos e participa da degradação de vários componentes celulares nas mais variadas condições fisiológicas (*e.g.*, jejum) e patológicas (*e.g.*, sepse) (WING & GOLDBERG, 1993). O lisossomo constitui o sítio de degradação desse sistema e pode ser definido como uma vesícula contendo altas concentrações de vários tipos de hidrolases ácidas, dentre elas as proteases, glicosidades, lipases, nucleases e fosfatases. O requerimento de um meio ácido para a ativação dessas enzimas confere uma proteção adicional ao interior celular contra a autodigestão disseminada, uma vez que somente o lúmen intralisossomal possui o pH

adequado (pH 4–5). As catepsinas L, B, D e H são as proteases mais importantes e determinam a capacidade proteolítica do lisossomo (BECHET et al., 2005). Essas enzimas são responsáveis por degradar grande parte das proteínas extracelulares e de membrana endocitadas bem como proteínas citoplasmáticas e organelas (TANIDA et al., 2004). O acesso do substrato às enzimas lisossomais depende de três principais processos intracelulares referidos como microautofagia, autofagia mediada por chaperonas e macroautofagia (KLIONSKY; EMR, 2000). A microautofagia ocorre em situações nutricionais consideradas normais e caracteriza-se por uma invaginação da superfície lisossomal que conduz à produção de vesículas, cujo conteúdo sofre degradação no interior dos lisossomas (BECHET et al., 2005). Já a autofagia mediada por chaperonas representa um mecanismo de seletividade proteolítica dentro do sistema lisossomal, uma vez que proteínas contendo uma seqüência peptídica similar à KFERQ (lisina-fenilalanina-glutamato-arginina-glutamina) ligam-se à proteína de choque térmico hsc73 (73 kDa) formando um complexo que é reconhecido para a degradação pelo lisossomo (WING et al., 1991). Essa via autofágica é importante em órgãos como o fígado e o coração, durante situações de privação alimentar (WING et al., 1991; FINN et al., 2006), mas não parece ocorrer em músculos esqueléticos (WING et al., 1991). A macroautofagia, por sua vez, possui como característica principal a formação de uma vesícula com membrana dupla, o autofagossomo, que se funde com o lisossoma formando o autolisossomo. É ativada em períodos iniciais do jejum no fígado e no músculo esquelético, sendo responsável pela degradação de proteínas dispersas em grandes porções no citosol e até mesmo organelas (KLIONSKY & EMR, 2000; MIZUSHIMA et al., 2004). O papel vital da autofagia foi demonstrado em camundongos neonatos com deleção de genes autofágicos que morrem logo após o nascimento (KOMATSU et al., 2005; KUMA et al., 2004). Os genes relacionados à autofagia (Atgs), inicialmente identificados em leveduras (OHSUMI, 2001), estão amplamente distribuídos em diferentes tecidos de humanos e animais, incluindo o

músculo esquelético (MIZUSHIMA et al., 2004; YAN et al., 2005). Tanida et al. (2004) demonstraram que as células de mamíferos expressam três proteínas homólogas à Atg8 de leveduras, que são a LC3 (do inglês, microtubule-associated protein light chain 3), a GABARAP (do inglês, γ -aminobutyric acid receptor-associated protein) e a GATE-16 (do inglês, Golgi-associated ATPase enhancer of 16 KDa). A LC3 possui papel fisiológico importante no processo de formação do autofagossomo (TANIDA et al., 2004) e por este motivo tem sido utilizada como um marcador de autofagia em diferentes tipos celulares (TANIDA et al., 2005). A LC3 se apresenta em duas formas, a LC3-I e a LC3-II. A primeira forma (LC3-I) é um produto da clivagem da região carboxi-terminal da LC3 pela Atg4B, gerando uma forma solúvel. Já a segunda forma (LC3-II) representa uma modificação na LC3-I pela Atg7 e Atg3, complexando-a, dessa maneira, a um fosfolípido de membrana (fosfatidiletanolamina) (GENG; KLIONSKY, 2008). Segundo Tanida et al. (2003), as duas outras proteínas homólogas da Atg8 (GABARAP e GATE16) sofrem modificações similares à LC3. Embora recentes trabalhos tenham mostrado o aumento da expressão gênica da LC3 e da GABARAP em músculo branco de ratos jejuados (MAMMUCARI et al., 2007), pouco se sabe a respeito do controle neural do sistema lisossomal e dos genes autofágicos em situações catabólicas.

O sistema proteolítico dependente de Cálcio baseia-se na atividade de cisteínas proteases conhecidas por calpaínas. Duas isoformas têm recebido mais atenção da comunidade científica: a calpaína 1 ou micro (μ)-calpaína e a calpaína 2 ou mili (m)-calpaína. Essa denominação faz referência às concentrações de Ca^{2+} *in vitro* necessárias para suas ativações. Vale ressaltar que este sistema proteolítico possui um inibidor endógeno, a calpastatina (TIDBALL & SPENCER, 2000). As calpaínas estão envolvidas em processos celulares como proliferação, diferenciação, migração e morte apoptótica (CARAFOLI & MOLINARI, 1998; NIXON, 2003; SUZUKI et al. 2004). A hiperativação do sistema

proteolítico dependente de Ca^{2+} ocorre em diversas condições patológicas como a sepse, a caquexia associada ao câncer e a doença de Alzheimer (WEI et al., 2005; BARTOLI et al., 2006; BOSSOLA et al., 2008; RAYNAUD & MARCILHAC, 2006).

Hoje, sabe-se que as proteínas miofibrilares mais abundantes no músculo esquelético, actina e miosina, não são diretamente degradadas pelas calpaínas (GOLL et al., 1991) e sim dissociadas da estrutura sarcomérica, após a clivagem específica de proteínas de ancoramento presentes do disco Z. Uma vez livres no citosol, estas proteínas miofibrilares podem ser degradadas pelo sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma (LOWELL et al., 1986). Toda proteína alvo de degradação pelo proteassoma precisa ser inicialmente ligada covalentemente a uma proteína de 76 aminoácidos chamada de ubiquitina (Ub). Hoje, sabe-se que o processo de ubiquitinação das proteínas depende da ação de 3 famílias de enzimas: a E1 ou enzima ativadora, a E2 ou enzima carreadora e a E3 ou Ub ligase, sendo esta a enzima limitante desta reação porque é ela que tem a capacidade de reconhecer, especificamente, os substratos protéicos a serem degradados e de ligá-los à Ub formando complexos poli-ubiquitinados. Entre os diferentes tipos de E3 conhecidas, as mais estudadas são a MuRF1 (do inglês, muscle ring finger protein 1) e a atrogina-1 (também chamada de MAFbx) (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001). Essas proteínas são expressas exclusivamente no músculo esquelético e cardíaco e estão envolvidas em uma série de modificações transcricionais que participam de um “programa atrófico” que precede a degradação de proteínas musculares pelo proteassoma (KRAWIEC et al., 2005). Dá-se o nome de atrogenes ao conjunto de genes que fazem parte deste programa, ou seja, que são hiperexpressos ou suprimidos em resposta à atrofia muscular, independentemente de sua causa. Entre aqueles que são ativados pode-se citar as Ub ligases, a Ub, a E2, a catepsina L e os genes autofágicos LC3 e GABARAP. Vários são os fatores hormonais que controlam a expressão dos atrogenes. Por exemplo, durante o jejum, o aumento da expressão gênica da MuRF1 e da atrogina-1 e a consequente

ativação do sistema proteolítico Ub-proteassoma que leva à perda de massa muscular ocorre devido ao aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticóides e da redução da secreção de insulina. No entanto, nada se sabe acerca do papel das catecolaminas e, mais especificamente, da adrenalina na expressão dos atrogenes, durante a privação alimentar.

O papel central da Akt na sinalização do metabolismo protéico

A Akt é uma proteína chave na sinalização dos processos de síntese e degradação protéica no músculo esquelético (GLASS, et al., 2003). Quando fosforilada por hormônios anabólicos como a insulina ou o IGF, a Akt torna-se ativa e pode controlar, em paralelo, o anabolismo e o catabolismo protéico muscular, por duas vias distintas: 1) via mTor (do inglês, mammalian target of rapamycin), aumentando a síntese protéica; 2) via FoxO3, inibindo a transcrição dos atrogenes e a degradação protéica (ZHAO et al., 2007).

Por outro lado, na ausência de hormônios anabólicos como, por exemplo, no jejum e no diabetes, onde os níveis insulinêmicos estão reduzidos, a fosforilação da Akt torna-se reduzida e o resultado é um aumento da degradação com redução da síntese protéica. Nessas situações, FoxO3 desfosforilado permanece ativo no núcleo estimulando a transcrição dos atrogenes (SANDRI et al., 2004) e a ativação do sistema proteolítico Ub-proteassoma. De fato, a expressão de FoxO3 constitutivamente ativo (FoxO3-ca) induz a expressão de múltiplos atrogenes e causa dramática atrofia em músculos de camundongos e culturas de miotubos (JAGOE & GOLDBERG, 2001; SANDRI et al., 2004). Recentes estudos têm demonstrado que os glicocorticóides, os quais permanecem elevados no jejum, podem reduzir a fosforilação da Akt no músculo esquelético (SCHAKMAN et al., 2008), em grande parte por promover a redução da atividade da PI3 Kinase (WANG et al., 2007).

Além da insulina e do IGF, a adrenalina parece ter um importante papel em estimular a fosforilação da Akt, por uma via independente da PKA (BRENNESVIK et al., 2005).

Recentemente, BAVIERA et al., (2009) demonstraram uma associação entre aumento da fosforilação da via Akt/FoxO3 e inibição da degradação de proteínas induzida pela adrenalina em músculos isolados de ratos normais.

Ações anabólicas da adrenalina no metabolismo de proteínas

Embora grandes avanços tenham sido feitos nas últimas décadas acerca das vias de sinalizações intracelulares e estrutura molecular das catepsinas, calpaínas/calpastatina e do proteassoma (STROBL et al., 2000), muito pouco se conhece sobre os fatores neurais, hormonais e nutricionais que regulam estes diferentes sistemas. Em estudos prévios de nosso laboratório, foi demonstrado que o bloqueio adrenérgico das terminações simpáticas periféricas e da liberação de adrenalina pela adrenal induzido pelo tratamento com guanetidina aumenta a degradação (NAVEGANTES et al., 1999) e diminui a síntese protéica (NAVEGANTES et al., 2004) em músculos *soleus* de ratos alimentados, após dois dias de tratamento. A partir dessas evidências, foi sugerido que o sistema nervoso simpático exerce um efeito anabólico tônico no metabolismo de proteínas musculares (NAVEGANTES et al., 1999). De fato, a administração de adrenalina em humanos promove diminuição dos níveis plasmáticos de aminoácidos (SHAMOON et al., 1980) e seu efeito *in vitro* resulta na redução da proteólise muscular (NAVEGANTES et al., 2000) e estimulação da síntese protéica. Em 2005, Yimlamai et al. demonstraram que o clenbuterol, um agonista adrenérgico-beta 2 seletivo, preveniu o aumento de conjugados de poliubiquitinas em músculos esqueléticos de ratos submetidos a um modelo de desuso. Kline et al. (2007) observaram aumento da fosforilação da Akt em músculos de ratos normais após tratamento com clenbuterol por 9 dias. Estes mesmos autores também demonstraram supressão da expressão gênica da MuRF1 e da atrogina-1 em músculos de ratos desnervados tratados com clenbuterol. Gonçalves et al. (2009) observaram que uma única injeção de clenbuterol é capaz de prevenir a

hiperexpressão das Ub ligases induzida pelo jejum de 48h em camundongos. Conjuntamente, estes dados sugerem que as ações das catecolaminas no metabolismo de proteínas são mediadas pela ativação direta de receptores β_2 -adrenérgicos, e resultam na inibição do sistema Ub-proteassoma. Uma vez que grande parte dessas evidências foi obtida utilizando-se agonistas adrenérgicos sintéticos, o significado fisiológico dessas possíveis ações hormonais na regulação da proteólise em uma situação fisiológica de atrofia muscular permanece ainda completamente desconhecido.

2.0. Objetivos

Tendo em vistas as considerações anteriormente citadas, o objetivo principal do presente trabalho foi estudar o papel fisiológico da adrenalina plasmática no metabolismo de proteínas musculares, durante o jejum.

2.1. Objetivos específicos:

Investigar em um modelo experimental de adrenodemedulação (após 10 dias da remoção cirúrgica da medula adrenal) em ratos jejuados por 2 dias e seus respectivos controles:

- 1) As concentrações plasmáticas das catecolaminas, as massas de diferentes tecidos e o perfil metabólico e hormonal;
- 2) A concentração intersticial (I), arterial (A) e a diferença I-A de tirosina (indicador de catabolismo protéico) no músculo tibial anterior *in vivo*;
- 3) As alterações hemodinâmicas (pressão arterial média e o fluxo sanguíneo muscular);
- 4) A proteólise total e a velocidade de síntese protéica *in vitro*;
- 5) As atividades das vias proteolíticas dependente de Ub-proteassoma, lisossomal e dependente de Cálcio em músculo EDL *in vitro*.
- 6) A expressão do RNAm dos atrogenes (atrogina-1, MuRF1, LC3 e GABARAP) e a fosforilação da Akt.

3.0. *Materiais e Métodos*

3.1. *Animais*

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar, com massa corporal entre 210 e 220g para os experimentos de microdiálise. E ratos jovens da mesma linhagem, pesando entre 55 e 60g, para os experimentos *in vitro*, provenientes do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo da USP de Ribeirão Preto (PCARP). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia, recebendo dieta balanceada (NUVLAB CR1 - NUVITAL) para roedores e água *ad libitum* em ambiente com ciclos luz-escuro de 12 horas (luzes acesas às 6:00 horas e apagadas às 18:00 horas) e temperatura controlada para 25°C. Todos os animais permaneceram nestas condições ambientais por pelo menos 24 horas antes de qualquer procedimento experimental. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP-USP (Protocolo nº 157/2008).

Os experimentos foram realizados pela manhã, sendo iniciados entre 8:00 e 9:00 horas. O sacrifício dos animais foi realizado por deslocamento cervical ou decapitação (quando necessário a coleta de sangue).

3.2. Modelo Experimental

3.2.1. Adrenodemedulação

Para o estudo do papel das catecolaminas plasmáticas no controle do balanço protéico, os animais foram submetidos à adrenodemedulação, 10 dias antes da microdiálise e dos experimentos *in vitro*.

Inicialmente, os animais foram anestesiados com a mistura de cloridrato de Xilazina e Ketamina (85 mg/kg e 10 mg/kg de massa corporal de rato, respectivamente; i.p.), o dorso foi tricotomizado e feitas duas incisões paralelas à coluna vertebral imediatamente abaixo da última costela. As glândulas adrenais depois de visualizadas foram pinçadas pela gordura peri-renal e cortadas na extremidade superior (córtex) com o auxílio de uma pequena lâmina. Em seguida, a glândula foi suavemente pressionada para retirada somente da medula adrenal. Após a excisão da porção medular, a glândula foi devolvida à cavidade peritoneal, o animal suturado com fio de nylon 4 e o campo cirúrgico limpo com álcool iodado para evitar infecções secundárias. O grupo controle sofreu o mesmo procedimento, exceto a remoção das glândulas adrenais.

3.2.2. Grupos experimentais

Os experimentos de microdiálise, de avaliação da proteólise total, assim como da participação dos sistemas proteolíticos e da velocidade de síntese protéica foram conduzidos em quatro grupos de animais divididos em:

- a) Grupo *Sham* Alimentado;
- b) Grupo Adrenodemedulado (ADMX) Alimentado;
- c) Grupo *Sham* Jejum (48h);
- d) Grupo Adrenodemedulado (ADMX) Jejum (48 h).

3.3. Estudo do metabolismo de proteínas pela microdiálise

3.3.1. Microdiálise: procedimento geral

Foram utilizados cateteres de microdiálise do tipo linear (figura 1A), os quais foram confeccionados, manualmente, utilizando uma membrana de diálise semipermeável (Cuprophane, 18 mm de comprimento por 0,3 mm de diâmetro, 3 kDa de limite de permeabilidade) colada em ambas as extremidade a tubos de polietileno PE-10 (comprimento padrão de 50 mm). As membranas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Peter Lönnroth, da Universidade de Gutemburgo (Suécia).

O cateter de microdiálise foi inserido longitudinalmente no músculo tibial anterior com auxílio de cânula-guia e perfundido a um fluxo constante de 1 µl/min com solução de perfusão (solução de NaCl 0,9% contendo glicose 1 mM, tirosina fria 50 µM, albumina bovina 0,5% e [¹⁴C]-tirosina) (figura 1B). Após um período de equilíbrio inicial de 30 minutos considerado a partir do início do gotejamento da solução de perfusão, os animais

foram dialisados ao longo de 60 minutos. O dialisado foi coletado diretamente em tubos de microcentrífuga e, em seguida, mantido a -20°C em solução de ácido tricloroacético (TCA 5%). O sangue coletado da artéria carótida esquerda foi imediatamente centrifugado, sendo o plasma separado e desproteínezado com ácido perclórico (PCA 1,5N) e congelado a -20°C . As concentrações de tirosina no dialisado (40 μl), na solução de perfusão (50 μl) e no plasma (100 μl) foram determinadas pelo método fluorimétrico descrito por WAALKES et al. (1957).

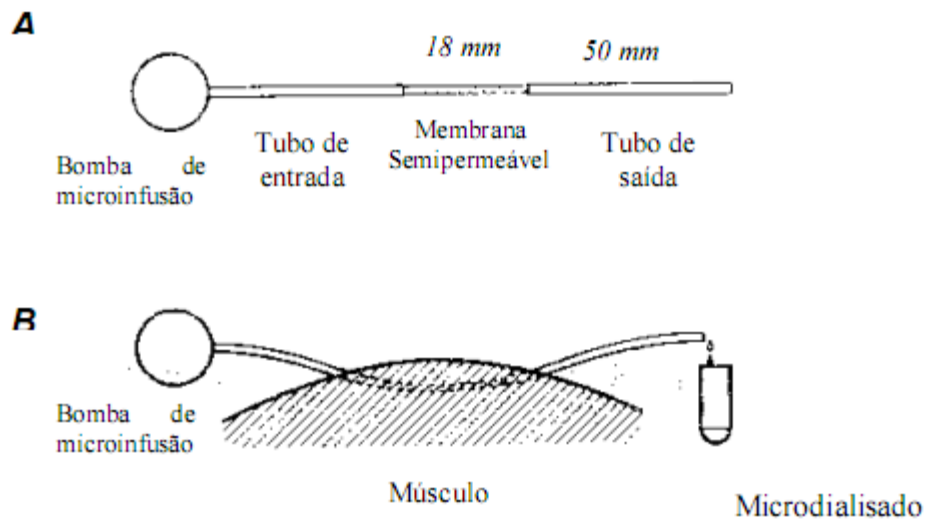


Figura 1. Desenho esquemático de um cateter linear (A). O cateter pode ser facilmente inserido no músculo esquelético com a ajuda de uma cânula-guia e conectado à bomba de microperfusão (B). Adaptado de Lönnroth et al. (1995).

3.3.2 Fator de Recuperação (“Recovery”) dos cateteres

Os cateteres de microdiálise foram individualmente calibrados *in vivo*, determinando-se a sua capacidade de recuperação de tirosina. Nesse trabalho, utilizou-se a técnica de referência interna, na qual os cateteres foram perfundidos com solução contendo [¹⁴C]-tirosina (~2500 DPM, 0,05 mmol/l) como marcador radioativo (LÖNNROTH et al., 1995). A difusão é um processo bidirecional, isto é, a saída de tirosina da solução de perfusão para o tecido é igual à entrada desta no cateter, de modo que a extração fracional da marca radioativa corresponde ao valor de recuperação do metabólito não marcado (LÖNNROTH et al., 1995).

A extração fracional da tirosina marcada foi obtida pela seguinte equação:

$$\text{FR (\%)} = (\text{SP} - \text{D}) / \text{SP} \times 100$$

Sendo, FR o fator de recuperação; SP a contagem da radioatividade em DPM na solução de perfusão e D a contagem da radioatividade em DPM no dialisado.

3.3.3. Cálculos para determinação da concentração intersticial de tirosina

Com a obtenção do fator de recuperação do cateter, da concentração de tirosina no dialisado e na solução de perfusão (perfusado), foi possível calcular a concentração intersticial de tirosina (nmol/ml) a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{[\text{Tyr}] \text{ interstício} = [\text{Tyr}] \text{ dialisado} - [\text{Tyr}] \text{ perfusado} + [\text{Tyr}] \text{ dialisado}}{\text{Fator de recuperação}}$$

Para saber se um tecido libera ou capta um substrato específico é necessário que se determine a presença de um gradiente, calculando-se a diferença entre as concentrações no interstício (I) e no sangue arterial (A). A presença de um gradiente onde a [Tyr] intersticial > [Tyr] arterial (diferença I-A) indica liberação local de tirosina pela célula.

3.3.4. Protocolo experimental.

No dia do experimento, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.), traqueostomizados e canulados na artéria carótida esquerda. Em seguida, o cateter de microdiálise foi inserido com auxílio da cânula-guia no músculo tibial anterior. Após os 30 minutos iniciais de equilíbrio, o músculo foi dialisado durante 60 minutos. Ao término da microdiálise, amostras do dialisado, solução de perfusão e sangue arterial foram coletadas para dosagem de tirosina e o músculo tibial anterior foi retirado para avaliação protéica pelo método de *Western blotting*. Durante todo o período de microdiálise a pressão arterial média foi aferida em intervalos de 10 minutos. Para os experimentos de microdiálise onde foi avaliado o fluxo sanguíneo muscular pela técnica fracional de etanol (descrita a seguir) o dialisado foi coletado em intervalos de 15 min (figura 2).

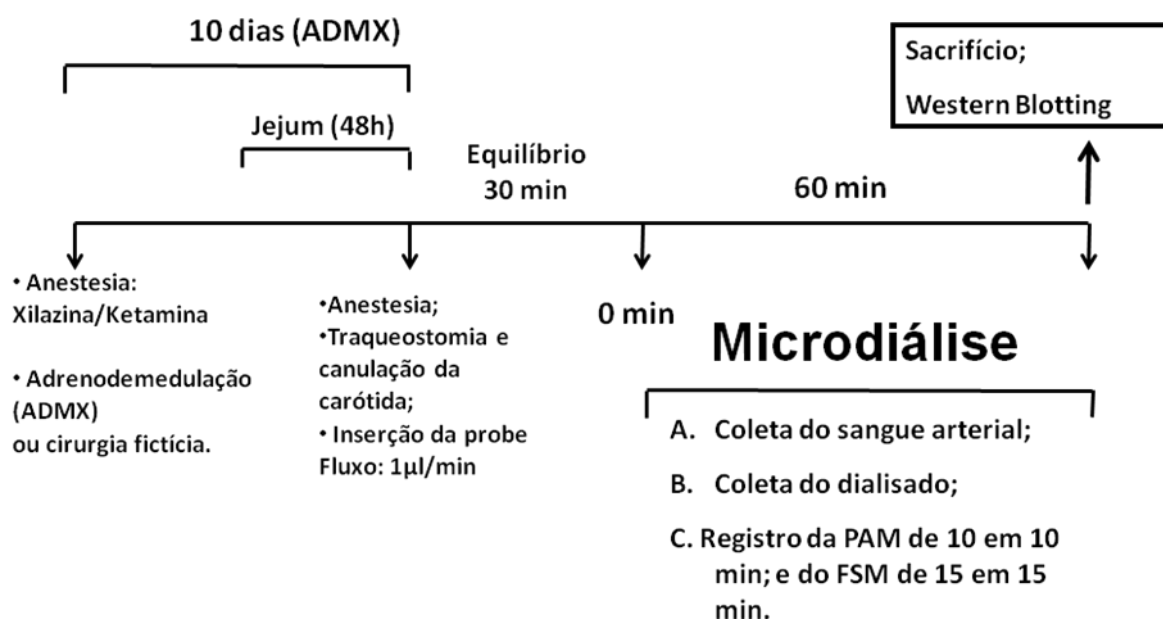


Figura 2. Protocolo experimental utilizado para o estudo dos efeitos da ADMX de 10 dias no metabolismo de proteínas na musculatura esquelética de ratos jejuados pela técnica de microdiálise.

3.4. Determinação dos parâmetros hemodinâmicos.

3.4.1. Pressão Arterial Média (PAM).

Para a avaliação do estado hemodinâmico dos animais, a PAM foi aferida em todo experimento de microdiálise. A PAM foi avaliada diretamente na artéria carótida em intervalos de 10 minutos por meio de um transdutor de pressão conectado a um amplificador (Braile Biomédica[®]).

3.4.2. Quantificação do Fluxo Sanguíneo Muscular (FSM).

Esses experimentos tiveram como objetivo avaliar o efeito da ADMX de 10 dias no fluxo sanguíneo muscular do tibial anterior de ratos jejuados por 48h. Para a avaliação qualitativa do FSM utilizou-se a técnica do *clearance* do etanol, que é adicionado á solução de perfusão do músculo. O princípio dessa técnica se baseia na propriedade do etanol ser um metabólito inerte, isto é, não é secretado nem absorvido pelo músculo (HICKNER et al., 1992). Existe uma relação inversamente proporcional entre a extração fracional do etanol e o fluxo sanguíneo muscular, de modo que toda redução na concentração de etanol no dialisado significa aumento do fluxo sanguíneo muscular (vasodilatação), assim como seu aumento no dialisado significa redução do fluxo sanguíneo (vasoconstrição). Nesses experimentos, o tibial anterior foi perfundido a um fluxo constante de 1 µl/min com solução de perfusão (descrita anteriormente) acrescida de etanol absoluto (5mM), durante 90 minutos. O etanol foi quantificado no dialisado muscular a cada 15 minutos durante o experimento e na solução de perfusão ao final deste (figura 2). Para se obter a extração fracional de etanol foi empregada a seguinte fórmula:

$$\text{Extração fracional} = ([Et_D] / [Et_{SP}])$$

Onde: $[Et_D]$: concentração de etanol (mmol/l) no dialisado;

$[Et_{SP}]$: concentração de etanol (mmol/l) na solução de perfusão.

3.5. *Catecolaminas plasmáticas*

Para quantificação da concentração de catecolaminas no plasma, os animais foram decapitados, o sangue coletado em tubos de vidro previamente heparinizados e centrifugados a 4°C. O plasma foi alíquotado e armazenado em freezer -70°C. No dia posterior, o plasma (~500 µl) foi transferido a tubos de plásticos contendo 50 mg de alumina ativada previamente em estufa a 100°C (30 minutos), 50 mg de metabissulfito de sódio, tampão Tris-HCl 2M (pH 8,9) e 2,5 de EDTA. Diidroxibenzilamina foi utilizado como padrão interno. As amostras foram agitadas por 20 minutos, centrifugadas e, após a aspiração do sobrenadante, a alumina foi lavada repetidamente. A adrenalina foi extraída da alumina pela adição de solução eluidora contendo ácido perclórico 0,1N por 10 minutos sob agitação mecânica (KRSTULOVIC, 1982).

Após a extração das catecolaminas, alíquotas de 100 µl foram analisadas através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em cromatógrafo modelo LC-74, equipado com uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS II (Sigma-Aldrich), acoplado a um detector eletroquímico modelo L-ESD-6A e a um polígrafo modelo C-R5A, todos de marca Shimadzu.

3.6. *Procedimento experimental para o estudo da proteólise em músculos esqueléticos de ratos*

Na manhã do experimento, os animais foram pesados e sacrificados por deslocamento cervical numa seqüência alternada entre os grupos, removendo-se rapidamente os músculos *extensor digitorius longus* (EDL) e o *soleus*. Em seguida, os músculos foram pesados em balança eletrônica digital (ACATEC 100), incubados com seus tendões fixados a suportes apropriados em tampão Krebs Ringer Bicarbonato (0,120M de NaCl; 0,015M de NaHCO₃;

4,828 mM de KCl; 1,2 mM de MgSO₄; 1,212 mM de KH₂PO₄; 2,4 mM de CaCl₂ - pH 7,4) e aerados.

O método de quantificação da atividade proteolítica utiliza músculos esqueléticos íntegros de ratos jovens, fixados por meio dos seus tendões a suportes de acrílico para o EDL e de alumínio para o *soleus*, mantendo-se assim os seus comprimentos de repouso (KETTELHUT, 1994). A manutenção dos músculos nestas condições possibilita a difusão de oxigênio e nutrientes, evitando-se a anóxia das fibras musculares centrais. Dessa forma, a proteólise muscular é reduzida, há manutenção dos conteúdos de ATP, de fosfocreatina e glicogênio, reproduzindo *in vitro* as características dos músculos em crescimento *in vivo*. Nestas condições, os músculos podem ser mantidos por até 9 horas em boas condições fisiológicas e morfológicas (KETTELHUT et al., 1988; 1994).

3.6.1. Avaliação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi estimada por meio da liberação do aminoácido 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 normalmente escolhida para a avaliação da proteólise por não ser catabolizada e nem sintetizada "*de novo*" pelo músculo. Além disso, esse aminoácido é facilmente dosado através de um método fluorimétrico simples e de grande sensibilidade e reprodutibilidade, 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 esse aminoácido é distribuído em todas as proteínas celulares (JEFFERSON et al., 1977).

Para a determinação da degradação de proteínas, os músculos EDL e *soleus* foram incubados em meios adequados, aerados com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂),

permanecendo por 1 hora em banho sob agitação constante a 37°C, a fim de estabelecer o equilíbrio da velocidade de liberação de tirosina para o meio de incubação. Após esse período de pré-incubação, os meios foram renovados e assim foi dada a continuidade à incubação com o mesmo tipo de meio por mais 2 horas. No final deste período, 1 mL do meio foi coletado e adicionado a 0,25 mL de ácido perclórico 1,5 N para a determinação da tirosina liberada.

3.6.2. Procedimentos experimentais para a avaliação dos sistemas proteolíticos

Os sistemas proteolíticos estudados em músculos esqueléticos EDL e *soleus* foram: o sistema lisossomal, o sistema dependente de cálcio (Ca^{2+}), o sistema dependente de Ub-proteassomal, seguindo os protocolos metodológicos descritos a seguir.

A. Sistema lisossomal

A quantificação da atividade proteolítica lisossomal foi feita através de um método que inibe esta via com a adição de metilamina, insulina e aminoácidos de cadeia ramificada – BCAA (leucina, isoleucina e valina) ao meio de incubação. A metilamina é uma base fraca que se acumula nos lisossomos, aumentando o pH intralisossomal para valores próximos à neutralidade (pH 5,9-6,2), inibindo assim a atividade das catepsinas e hidrolases ácidas lisossomais (MORTIMORE, 1982; KETTELHUT et al., 1988). Os BCAA e a insulina atuam por meio de bloqueio da formação de vacúolos autofágicos e também pela diminuição da fragilidade lisossomal nos músculos esquelético e cardíaco. Portanto, esses agentes inibem a degradação protéica, sem alterar o conteúdo total de enzimas lisossomais (RANNELS et al., 1975; JEFFERSON et al., 1977; KETTELHUT et al., 1988).

A tabela 1 ilustra as condições de incubação dos músculos utilizados.

Tabela 1 - Protocolo utilizado para a quantificação da proteólise total e da proteólise lisossomal.

MÚSCULOS (COM TENDÕES FIXOS A SUPORTES)		
RETIRADOS DAS 2 PATAS		
<i>COMPONENTES DO MEIO</i>	<i>MÚSCULOS</i>	
	<i>Direito</i>	<i>Esquerdo</i>
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4)	+	+
Glicose (5 mM)	+	+
Cicloheximida (0,5 mM)	+	+
Metilamina (10 mM), insulina (0,1 U/ml) e BCAA*	-	+

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

A liberação da tirosina dos músculos da pata direita, incubados na ausência de qualquer inibidor farmacológico, corresponde à proteólise total, enquanto que a diferença entre a proteólise observada no músculo da pata direita e esquerda reflete a participação do sistema lisossomal (tabela 1).

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

B. Sistema dependente de Cálcio

A quantificação da atividade do sistema dependente de Cálcio consiste em utilizar os dois músculos contralaterais com seus tendões fixados a suportes, incubando-se um deles em meio Krebs sem Ca^{2+} e com a adição de inibidores das proteases do grupo tiol como a leupeptina. O objetivo desse procedimento é inibir as calpaínas *in vitro*. Assim, a diferença entre os valores de proteólise do músculo incubado em condições basais (pata direita) com o músculo apresentando o sistema enzimático das calpaínas inibido (pata esquerda) reflete a participação do sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} (tabela 2).

Tabela 2 - Protocolo utilizado para a quantificação do sistema dependente de Ca^{2+} .

MÚSCULOS (COM TENDÕES FIXOS A SUPORTES)		
RETIRADOS DAS 2 PATAS		
<i>COMPONENTES DO MEIO</i>	<i>MÚSCULOS</i>	
	<i>Direito</i>	<i>Esquerdo</i>
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4)	+	+
Glicose (5 mM)	+	+
Cicloheximida (0,5 mM)	+	+
Metilamina (10 mM), insulina (0,1 U/ml) e BCAA*	+	+
Leupeptina (50 μM)	-	+
Cálcio	-	+

* leucina: 0,5 mM; isoleucina: 0,85 mM; valina: 1,0 mM trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano

C. Sistema dependente de ubiquitina (Ub)-proteassoma

Foram utilizados músculos incubados com seus tendões fixos a suportes em meio isento de Ca^{2+} , contendo leupeptina, insulina e BCAA com a finalidade de bloquear simultaneamente as atividades proteolíticas dependente de Ca^{2+} e lisossomal. Além disso, a inibição direta do proteassoma foi obtida com o uso do inibidor MG132 (N-carboxibenzoxi-Leu-Leu-Leucinal). O MG132 é um peptídeo aldeído que inibe a atividade proteolítica do proteassoma sem afetar as atividades ATPásicas ou isopeptidásicas.

A avaliação do componente proteolítico dependente de Ub-proteassoma foi realizada utilizando as condições de incubação descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Protocolo utilizado para a quantificação da proteólise dependente de Ub-proteassoma e da atividade proteolítica independente de ATP (residual).

MÚSCULOS (COM TENDÕES FIXOS A SUPORTES) RETIRADOS DAS 2 PATAS		
COMPONENTES DO MEIO	MÚSCULOS	
	<i>Direito</i>	<i>Esquerdo</i>
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4, - Ca^{++})	+	+
Glicose (5 mM)	+	+
Cicloheximida (0,5 mM)	+	+
Metilamina (10 mM), insulina (0.1 U/ml) e BCAA*	+	+
E64 (25 μ M) e leupeptina (50 μ M)	+	+
MG132 (20 μ M)	-	+

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

Pela medida da diferença entre a proteólise observada no músculo da pata direita, considerada a proteólise não lisossomal e independente de Ca^{2+} , a qual se chama de “basal” e a proteólise observada na pata esquerda com a atividade proteassomal bloqueada é possível quantificar com reprodutibilidade o processo proteolítico dependente de Ub-proteassoma (tabela 3).

3.7. Procedimento experimental para a avaliação da síntese total de proteínas em músculos esqueléticos de ratos

A síntese total de proteínas foi determinada em músculos EDL e *soleus* de ratos alimentados e jejuados, após 10 dias de ADMX ou cirurgia fictícia (*Sham*). Os músculos foram incubados com seus tendões fixos a suportes apropriados para manutenção dos seus comprimentos de repouso, em tampão Krebs Ringer Bicarbonato, contendo glicose (5 mM) e todos os vinte aminoácidos, em concentrações semelhantes às encontradas no plasma de ratos, conforme apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Aminoácidos adicionados ao meio de incubação (SCHARFF & WOOL, 1966) para avaliação da velocidade de síntese protéica total.

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

Uma vez que a tirosina também foi adicionada ao meio de incubação, não foi possível usar o mesmo músculo para a avaliação de síntese e de degradação protéica simultaneamente, pois a proteólise foi estimada pela medida da tirosina liberada e o método não tem sensibilidade para detectar estas diferenças.

Após um período de 1 hora de pré-incubação, o meio de incubação foi substituído por meio idêntico acrescido de tirosina marcada ([U-¹⁴C] tirosina; 0,05 μ Ci/mL), tendo permanecido os músculos incubados por um período final de 2 horas. Em seguida, os músculos foram removidos de seus suportes e lavados com água destilada fria, secos em papel de filtro e colocados em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após homogeneização e

centrifugação a 1800g por 10 minutos, 1 ml do sobrenadante foi utilizado para a avaliação da tirosina livre total no músculo e uma alíquota de 100 µl foi usada na medida da radioatividade, para a determinação da atividade específica da tirosina de cada músculo separadamente. Posteriormente, o precipitado foi lavado 3 vezes com 2 mL de TCA 10%. A dissolução do precipitado final foi obtida pela adição de 1 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, a temperatura ambiente por 12 horas ou em banho-maria a 40°C por 2 horas. A seguir, foram adicionados 10 mL de coquetel de cintilação para contagem da radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB 2100TR, Packard BioScience Company, EUA).

3.8. Avaliação da Expressão Gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

a) Extração de RNA

O músculo EDL de ratos *Sham* e ADMX alimentados e jejuados foi extraído imediatamente após o deslocamento cervical para extração do RNA pelo método do *Trizol*TM (Invitrogen Life Technologies, Carlsberg, CA). Após a extração, o tecido foi congelado em nitrogênio líquido, macerados em cadinho de porcelana, homogeneizados em solução de *Trizol*TM na proporção de 100mg tecido para 1mL *Trizol*TM e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de clorofórmio foi adicionado e após 15 segundos de agitação vigorosa em vórtex a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 12.000g e a 4°C. A fase superior aquosa (contendo RNA) foi coletada e em seguida o RNA foi precipitado com 500µL de álcool-isopropílico. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, a amostra foi novamente centrifugada. Ao final, os *pellets* foram lavados com etanol 75% e solubilizados em 50 µL de água DEPC (água milli-Q tratada com dietil-pirocarbonato 0,01%

e autoclavada).

b) Quantificação das amostras de RNA

As amostras foram quantificadas por densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. A qualidade da extração foi conferida pela relação DO_{260nm}/DO_{280nm} , um indicador de contaminação da amostra com proteínas. As amostras de RNA foram mantidas em freezer - 80°C para posterior utilização nas reações de transcrição reversa.

c) Produção de cDNA - Transcrição Reversa (RT)

As reações de transcrição reversa foram realizadas para obtenção de cDNAs, utilizando 2µg de RNA total na presença de 50 ng de *primer* oligo(dT) e 1U de *ImProm IITM Reverse Transcriptase* (Promega, Madison, WI), de acordo com as condições padrão do fabricante. As condições usadas no termociclador PTC 100 (MJ Research, Watertown, MA) foram: 5 minutos à 70°C (anelamento do *primer*), seguindo-se da adição da enzima transcriptase reversa e 60 minutos à 42°C (polimerização) e então 15 minutos à 70°C (inativação da enzima).

O conteúdo de RNAm da proteína ciclofilina de camundongos foi usado como controle para verificação da quantificação dos RNA purificados. Para se certificar da pureza do RNA extraído, foi realizado um controle negativo, no qual não foi adicionada a enzima transcriptase reversa, com o objetivo de identificar uma possível existência de DNA genômico na amostra. Nenhuma banda foi observada nas PCRs destas amostras para os genes analisados.

*d) PCR em tempo real***- Primers utilizados**

A seqüência dos *primers* foi obtida a partir da seqüência dos genes depositada no GenBank para atrogina-1 e ciclofilina (tabela 5).

TABELA 5- Seqüências dos *primers* utilizados para as reações de RT-PCR.

Gene	Seqüência	Produto
Atrogina-1	<i>Sense:</i> TGAAGACCGGCTACTGTGGAAGAGAC <i>Antisense:</i> TTGGGGTGAAAGTGAGACGGAGCAG	486 pb
MuRF1	<i>Sense:</i> TCG ACA TCT ACA AGC AGG <i>Antisense:</i> TCC TTG GAA GAT GTC	486 pb
LC3	<i>Sense:</i> TTT GTA AGG GCG GTT CTG <i>Antisense:</i> CAG GTA GCA GGA AGC AGA	486 pb
GABARAP	<i>Sense:</i> CTT TCC CCT TGT TTA CCC TCC <i>Antisense:</i> CCC AAT GTC AAC CCC	486 pb
Ciclofilina	<i>Sense:</i> GAC TTC ATG ATC CAG GG <i>Antisense:</i> TGA CAT CCT TCA GTG GCT TG	486 pb

-Amplificação do cDNA

Reações de PCR com volume final de 25µL foram realizadas utilizando uma concentração final de 0,1 µM de cada *primer* (*Sense* e *Antisense*), 1,5mM MgCl₂, 1X tampão NH₄⁺, 200µM de cada dNTP, 10% DMSO, 2 unidades de Taq Polimerase *Pht* (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda, MG, Brasil) e 1µL de cDNA, o volume final foi completado com água milli Q. O programa utilizado no termociclador PTC100 (MJ Research, Watertown, MA) foi de 94°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de 94° C por 30 segundos, 47° C por 1 minuto e 72° C por 1,5 minutos, finalizando com uma etapa de 10 minutos a 72° C. Para ciclofilina, foi de 94°C por 5 minutos, seguido de 22 ciclos de 94° C por 1 minuto, 56° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto, finalizando com uma etapa de 10 minutos a 72° C. A expressão dos atrogenes (atrogina-1, MuRF1, LC3 e GABARAP) foi calculada utilizando a expressão da ciclofilina como normalizador (controle interno endógeno).

3.9. 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 poliacrilamida 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 de coelho das seguintes proteínas analisadas: Akt (1:2000, Cell Signalling, EUA), Akt p-Ser⁴⁷³ (1:1000, Cell Signaling, EUA)– BostonBiochem, EUA) e β -actina (1:3.000; anticorpo de camundongo anti- β -actina – Santa Cruz). As diluições dos anticorpos primários foram realizadas em solução de TBS-T contendo 2,5% de albumina bovina sérica e 0,01% de azida sódica. O anticorpo foi então retirado 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 camundongo, diluição de 1:5.000 em TBS-T e anti-IgG de coelho, diluição de 1:7.500 em TBS-T). Após lavagem das membranas para remoção do excesso de anticorpo secundário não ligado, a membrana foi revelada com filme autoradiográfico Hyperfilm ECLTM (Amersham Biosciences, EUA), na ausência de luz, variando entre 2 a 45 minutos após a adição de partes iguais dos reagentes do Kit de Quimioluminescência Amplificada Amersham ECLTM (Amersham Biosciences). As bandas reveladas foram fotografadas e quantificadas por densitometria utilizando o *software* ImageJ versão 1.41o (*National Institutes of Health*, EUA).

3.10. Análises bioquímicas

O sangue foi coletado em tubos heparinizados, após decapitação dos animais. Em seguida, o sangue foi centrifugado para obtenção do plasma e a concentração plasmática de glicose e lactato foram determinadas em analisador bioquímico YSI modelo 2700 SELECT[®] (YSI Bioanalytical Products, EUA). 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 e plasma.

3.11. Determinação do glicogênio hepático e muscular

As determinações do conteúdo de glicogênio foram realizadas a partir de amostras de tecido hepático (500mg) e muscular colhidas imediatamente após o sacrifício dos animais. Os tecidos pesados foram colocados em tubos de centrifuga contendo 2 mL de KOH 30%. A extração foi realizada através do método de Sjögren et al. (1938) e a quantificação do glicogênio hepático e muscular foi realizada pelo método da antrona segundo Carrol et al. (1956).

3.12. Análise estatística

Os resultados foram expressos como Médias \pm EPM (Erro Padrão da Média). Para a análise estatística dos resultados foi empregado o teste “*t*” de *Student* para comparação entre dois grupos e a análise de variância multivariada com dois fatores (two-way RM ANOVA), seguido do teste de *Holm-Sidak*, foi utilizado para comparação de mais de dois grupos. O nível de significância aceito foi de 5% (*i.e.*, $P \leq 0,05$).

4.0. Resultados

4.1. Caracterização do modelo experimental em animais adultos.

4.1.1. Efeito da ADMX na massa corporal.

A figura 3 apresenta os resultados do efeito da ADMX, ao longo de 10 dias, na massa corporal de animais alimentados e jejuados. Verifica-se que o jejum por 48h reduziu em aproximadamente 30g a massa corporal dos animais *Sham* e ADMX. Podemos observar também que a ADMX não interferiu na massa corporal dos animais tanto alimentados quanto jejuados (figura 3).

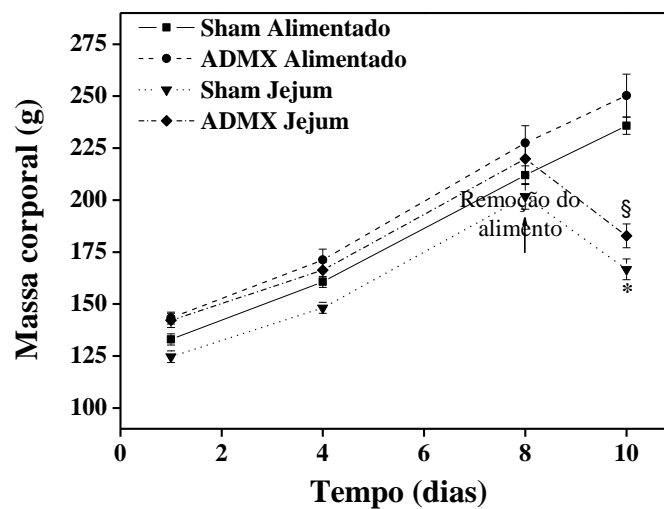


Figura 3. Efeito da adrenodemedulação (ADMX) na curva de ganho de massa corporal dos animais alimentados (n=8) e jejuados por 48h (n=9) ao longo de 10 dias. A seta indica o início do jejum. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* alimentado. § $p \leq 0,05$ em relação ao grupo ADMX alimentado.

4.1.2. Efeito da ADMX nas concentrações das catecolaminas plasmáticas

Com o objetivo de comprovar a eficiência da simpatectomia induzida pela ADMX, foram determinadas as concentrações plasmáticas das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). Observa-se na figura 4 que a ADMX de 10 dias praticamente aboliu a concentração plasmática de adrenalina (figura 4A) e reduziu em 60% a concentração de noradrenalina (figura 4B). Pode-se constatar também nesta figura que o jejum não alterou as concentrações de ambas as catecolaminas quando comparadas ao grupo alimentado.

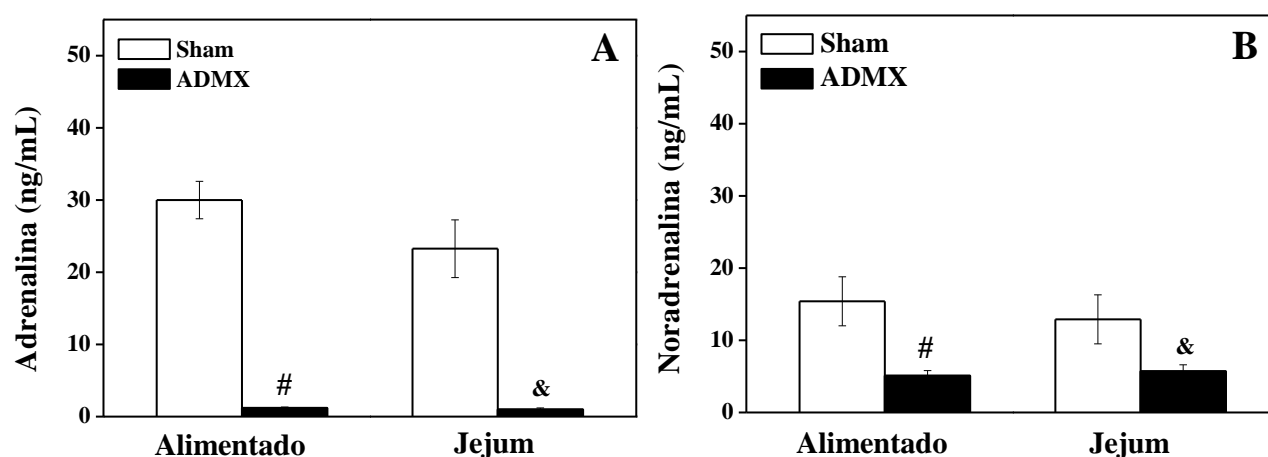


Figura 4. Efeito da adrenodemedulação (ADMX) de 10 dias na concentração plasmática de adrenalina (A) e noradrenalina (B) nos animais alimentados (n=8) e jejuados por 48h (n=8). Os valores são expressos como média \pm EPM. # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* alimentado. & $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* jejum.

4.1.3. Efeito da ADMX em diferentes parâmetros hormonais, metabólicos e massa do tecido adiposo e muscular

A tabela 6 apresenta os valores das concentrações plasmáticas de corticosterona, glicose e lactato nos grupos ADMX e *Sham* alimentados ou jejuados por 48h. Verifica-se nesta tabela que o jejum, assim como esperado, aumentou os níveis de corticosterona em animais *Sham* e que a incisão feita no córtex da adrenal na ocasião da ADMX não alterou as concentrações plasmáticas de corticosterona tanto em animais normais como em jejuados.

Os níveis plasmáticos de glicose e lactato foram reduzidos no jejum em 43% e 65%, respectivamente (tabela 6), assim como o conteúdo de glicogênio muscular (51%) (figura 5A) e hepático (100%) (figura 5B). A ADMX reduziu em 16% os níveis de lactato no plasma em animais alimentados em relação ao grupo *Sham* (tabela 6). O conteúdo de glicogênio muscular não foi alterado em animais ADMX alimentados e jejuados. No entanto, a queda do conteúdo de glicogênio hepático induzida pelo jejum foi significativamente menor no grupo ADMX (figura 5B).

Tabela 6. Concentrações plasmáticas de corticosterona, glicose e lactato, após 10 dias da adrenalectomia (ADMX), em animais alimentados e jejuados por 48h.

		Corticosterona	Glicose	Lactato
		(μ U/dl)	(mg/dl)	(μ mol/ml)
Alimentado	Sham	10,72 \pm 1,9 (8)	146,10 \pm 5,17 (8)	1,35 \pm 0,09 (8)
	ADMX	10,30 \pm 0,92 (8)	148,24 \pm 2,02 (8)	1,13 \pm 0,06 [#] (8)
Jejum	Sham	22,07 \pm 1,41* (7)	83,61 \pm 3,04* (7)	0,470 \pm 0,03* (7)
	ADMX	21,31 \pm 1,47 [§] (10)	91,32 \pm 2,61 [§] (10)	0,520 \pm 0,03 [§] (10)

Os valores são expressos como média \pm EPM. Os valores entre parênteses indicam o número de animais utilizados. * $p \leq 0,05$; # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* alimentado. § $p \leq 0,05$ em relação ao grupo ADMX alimentado.

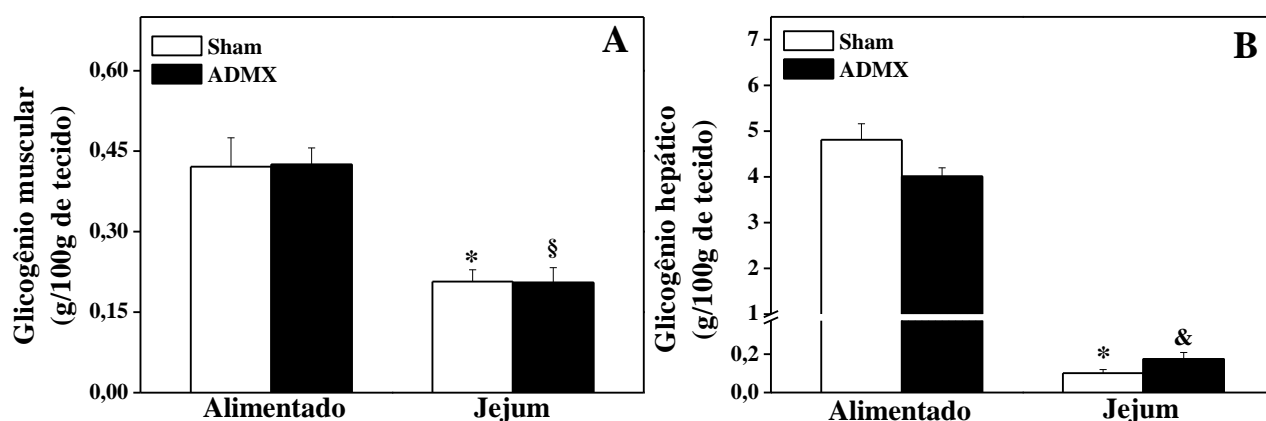


Figura 5. Efeito da adrenodemedulação (ADMX) de 10 dias no conteúdo de glicogênio muscular (A) e hepático (B) nos animais alimentados e jejuados por 48h. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Sham alimentado. § $p \leq 0,05$ em relação ao grupo ADMX alimentado. & $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Sham jejum.

A figura 6 apresenta os resultados referentes às massas do tecido adiposo branco (TAB) nos diferentes grupos experimentais. Como pode ser verificado, o jejum em animais Sham reduziu em 30% e 10%, respectivamente, as massas do TAB retroperitoneal (figura 6A) e epididimal (figura 6B). Pode também ser observado na figura 6 que a depleção das catecolaminas plasmáticas induzida pela ADMX reduziu as massas do TAB retroperitoneal (~50%) (figura 6A) e epididimal (~35%) (figura 6B) em animais alimentados e exacerbou a redução das massas desses tecidos induzida pelo jejum (figuras 6A e B). A redução do TAB no jejum foi acompanhada por um aumento nos níveis plasmáticos de AGL no grupo Sham como mostrado na figura 7. Observou-se também um aumento na concentração de AGL no plasma de animais alimentados ADMX (figura 7) em relação ao grupo Sham. A depleção da adrenalina plasmática nos animais ADMX atenuou o aumento dos níveis plasmáticos de AGL (figura 7) induzido pelo jejum.

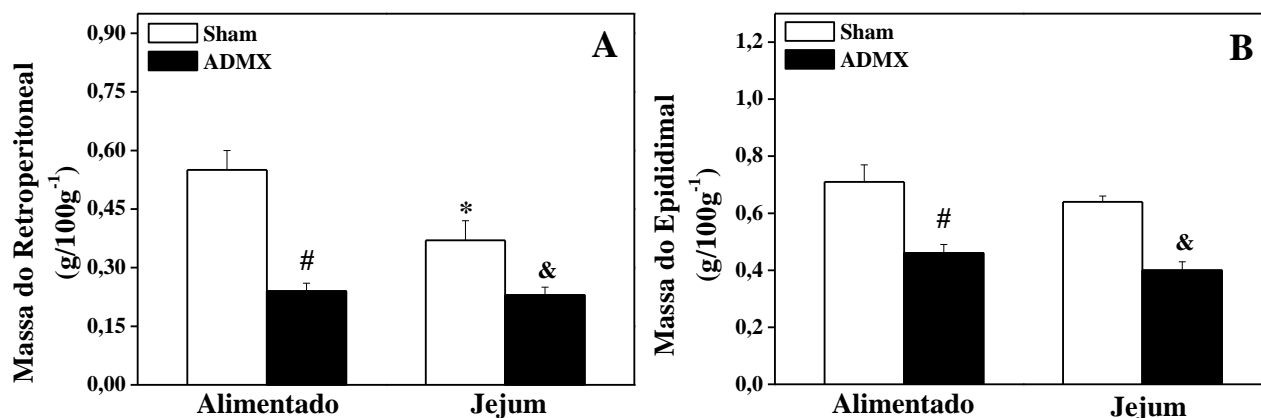


Figura 6. Efeito da adrenalectomia (ADMX) de 10 dias na massa do tecido adiposo retroperitoneal (A) e epididimal (B) nos animais alimentados e jejuados. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0,05$; # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* alimentado. & $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* jejum.

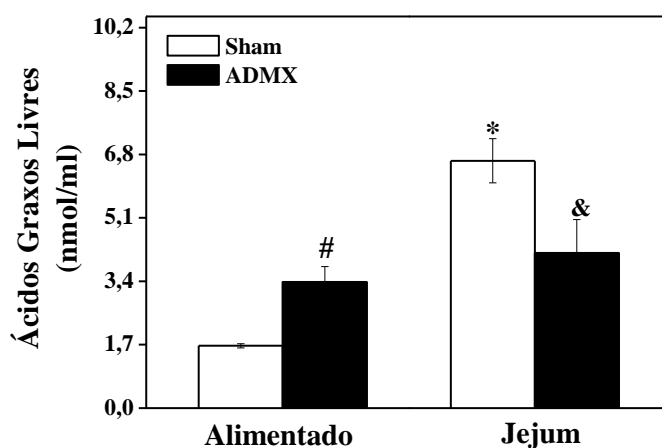


Figura 7. Efeito da adrenalectomia (ADMX) de 10 dias nas concentrações plasmáticas de Ácidos Graxos Livres (AGL) nos animais alimentados e jejuados por 48h. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0,05$; # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* alimentado. & $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* jejum.

A massa total do músculo tibial anterior de animais do grupo *Sham* foi reduzida em 16% pelo jejum e a ADMX não alterou esse parâmetro tanto nos animais alimentados quanto nos jejuados (figura 8).

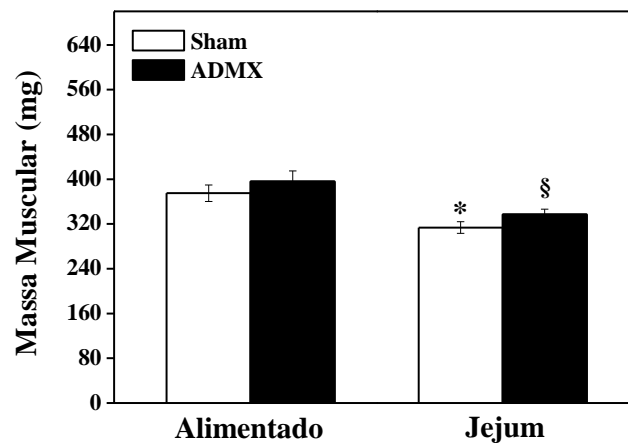


Figura 8. Efeito da adrenodemedulação (ADMX) de 10 dias na massa do músculo tibial anterior nos animais alimentados e jejuados por 48h. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* alimentado. § $p \leq 0,05$ em relação ao grupo ADMX alimentado.

4.2. Efeito in vivo da ADMX na pressão arterial média, fluxo sanguíneo muscular e no metabolismo de proteínas musculares em animais adultos alimentados e jejuados

4.2.1. Alterações Hemodinâmicas

As figuras 9 e 10 mostram os efeitos da remoção cirúrgica da medula da adrenal, em animais alimentados e jejuados, na pressão arterial média (PAM) (figura 9) e no fluxo sanguíneo muscular (FSM) (figura 10), respectivamente, ao longo do experimento de microdiálise. Pode-se observar que estes parâmetros hemodinâmicos mantiveram-se constantes ao longo do tempo e não foram diferentes entre os diferentes grupos experimentais.

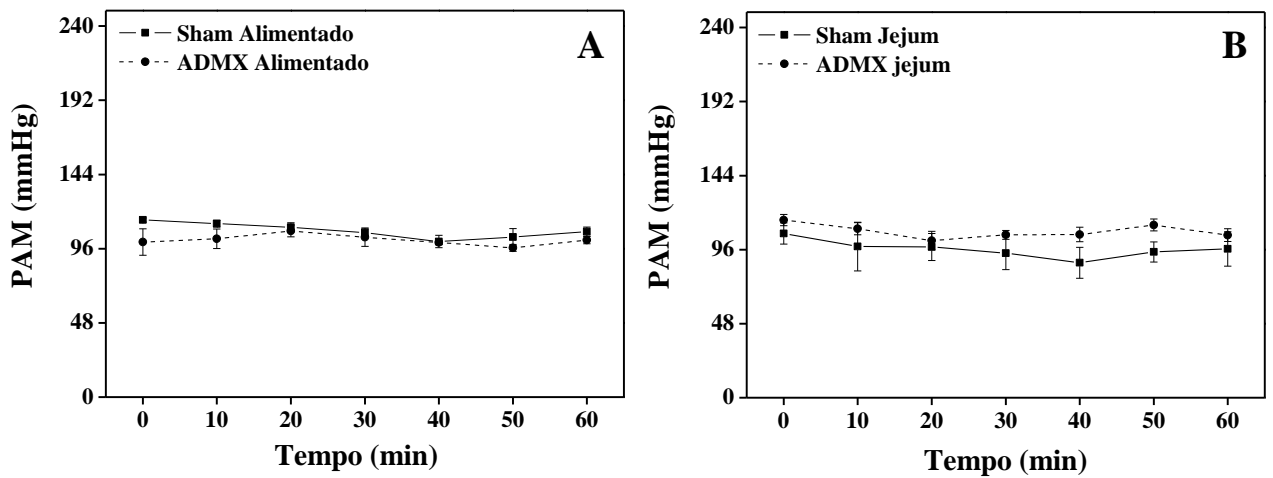


Figura 9. Efeito da adrenalectomia (ADMX) de 10 dias na pressão arterial média (PAM) de ratos alimentados (A; n=6) e jejuados por 48h (B; n=7), durante 60 min de microdialise. Os valores são expressos como média \pm EPM.

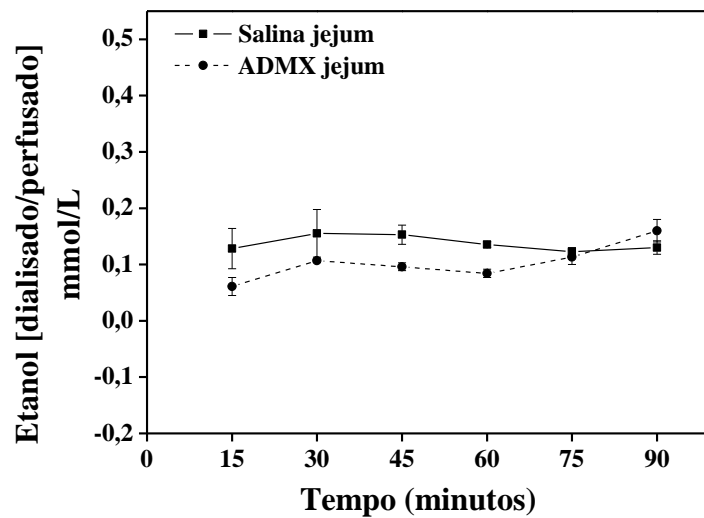


Figura 10. Efeito da adrenalectomia (ADMX) de 10 dias no fluxo sanguíneo muscular estimado pela extração fracional de etanol no músculo Tibial anterior de ratos jejuados (n=6), durante 90 min de microdialise. Os valores são expressos como média \pm EPM.

4.2.2. Concentrações intersticial (I), arterial (A) e diferença I-A de tirosina muscular

A Figura 11 apresenta os efeitos da ADMX nos valores médios das concentrações intersticial (I), arterial (A) e do gradiente I-A de tirosina muscular em animais alimentados (figura 11A) e jejuados (figura 11B). Observa-se que a ADMX não afetou nenhum desses parâmetros em ratos alimentados (figura 11A). O mesmo ocorreu com o grupo *Sham* submetido ao jejum (dados não apresentados). Por outro lado, no grupo ADMX jejum, a depleção da adrenalina aumentou em 50% a liberação muscular de tirosina para o interstício e em 100% a diferença I-A, sem modificar a concentração arterial deste aminoácido (figura 11B). Estes resultados indicam claramente um aumento do catabolismo protéico no tecido muscular de ratos ADMX jejuados.

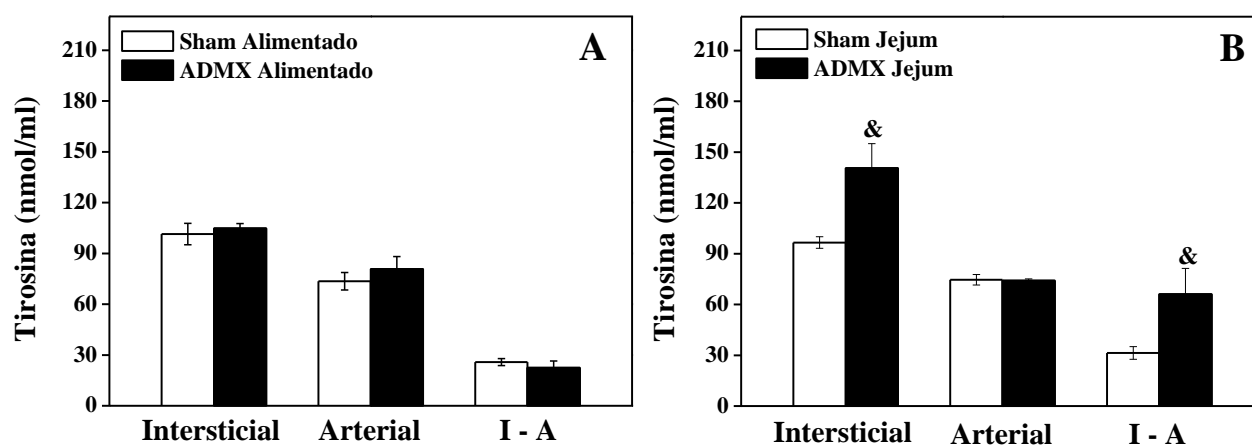


Figura 11. Efeito da adrenodemedulação (ADMX) de 10 dias nas concentrações intersticial (I), arterial (A) e na diferença I-A de tirosina muscular em animais alimentados (A) e jejuados (B). Os valores são expressos como média \pm EPM. [&] $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* jejum.

4.3. Efeito da ADMX no metabolismo de proteínas em músculos isolados de animais jovens alimentados e jejuados

Após a caracterização de nosso modelo experimental e avaliação dos efeitos da ADMX no metabolismo de proteínas *in vivo* em músculos esqueléticos de ratos adultos, investigou-se o efeito da ADMX na massa muscular, síntese protéica, degradação total de proteínas, assim como na atividade dos diferentes sistemas proteolíticos em músculos *soleus* (oxidativo) e EDL (glicolítico) de animais jovens alimentados e jejuados. Com relação à massa dos músculos estudados, observou-se uma clara redução de 26% no EDL (figura 12A) e de 17% no *soleus* (figura 12B), após o período de restrição alimentar. De forma semelhante ao que foi observado em animais adultos, as massas de ambos os músculos não foram alteradas pela ADMX.

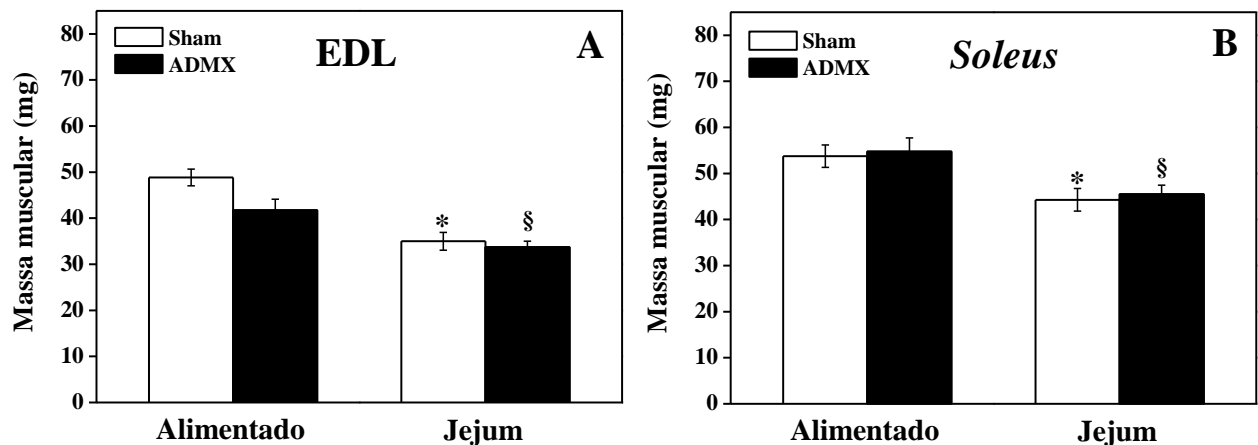


Figura 12. Efeito da adrenodemedulação (ADMX) de 10 dias na massa dos músculos EDL (A) e *soleus* (B) de ratos alimentados e jejuados por 48h. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Sham alimentado. § $p \leq 0,05$ em relação ao grupo ADMX alimentado.

4.3.1. Síntese protéica

A velocidade de síntese de proteínas foi avaliada por meio da incorporação do aminoácido tirosina marcada com ^{14}C em proteínas totais de músculos EDL e *soleus* isolados de ratos adrenodemedulados alimentados e jejuados. Como esperado, a síntese protéica de animais sob privação alimentar foi reduzida nos músculos EDL (figura 13A) e *soleus* (figura 13B) em 50% e 67%, respectivamente. A remoção da medula da adrenal não alterou a síntese protéica em ambos os músculos dos animais em jejum, mas como pode ser observado na figura 13 aumentou em 21% a incorporação de tirosina em proteínas totais nos músculos EDL (figura 13A) e *soleus* (figura 13B) de animais alimentados.

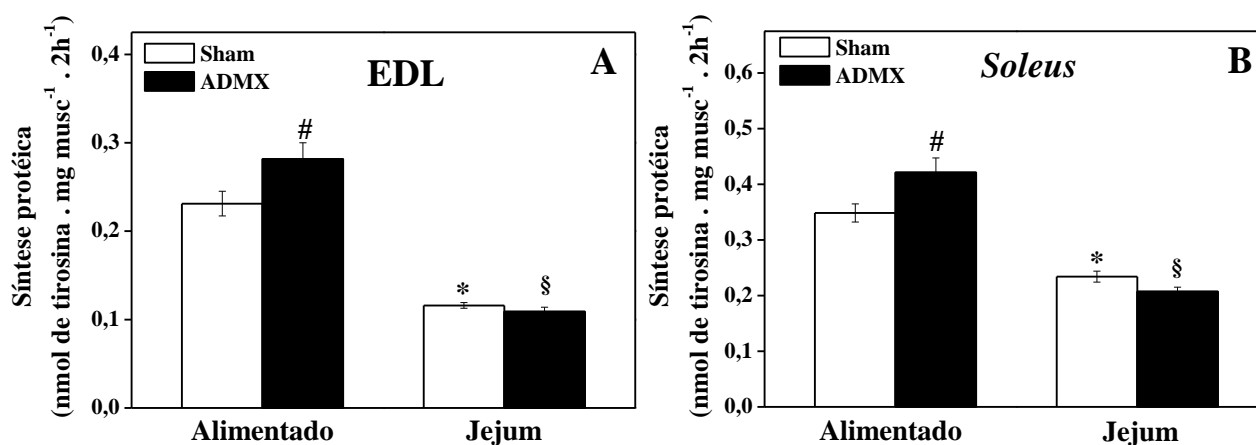


Figura 13. Efeito da adrenodemedulação (ADMX) de 10 dias na velocidade de síntese protéica nos músculos EDL (A) e *soleus* (B) de animais alimentados e jejuados por 48h. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=8). * $p \leq 0,05$; # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Sham alimentado. § $p \leq 0,05$ em relação ao grupo ADMX alimentado.

4.3.2. Proteólise Total

O efeito da ADMX na degradação total de proteínas foi estimado por meio da liberação de tirosina ao meio de incubação, na presença de um inibidor da síntese protéica. A figura 14 apresenta os valores médios obtidos na proteólise total de animais alimentados e jejuados após 10 dias da ADMX. O jejum, como pode ser observado nesta figura, aumentou a degradação total de proteínas no músculo EDL em 30%, mas não afetou o músculo *soleus* (figura 14B). Observa-se que a ADMX não alterou a degradação de proteínas nos músculos EDL (figura 14A) e *soleus* (figura 14B) de animais alimentados. Entretanto, a depleção da adrenalina plasmática promove um aumento adicional de 30% na degradação total de proteínas no músculo EDL de animais jejuados (figura 14A). Esses resultados demonstram claramente que a remoção da medula da adrenal aumenta a degradação total de proteínas induzida pelo jejum em músculos glicolíticos como o EDL.

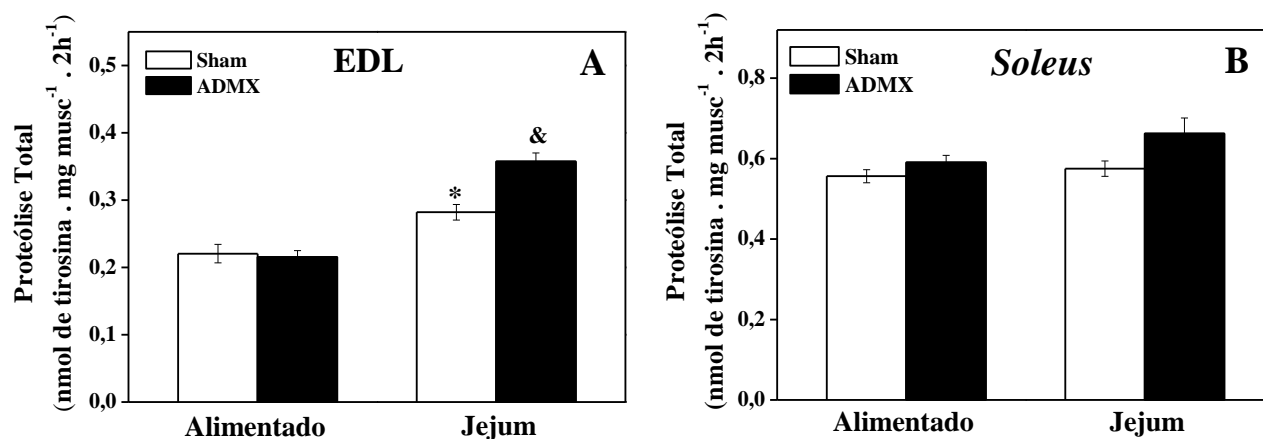


Figura 14. Efeito da adrenodemedulação (ADMX) de 10 dias na degradação total de proteínas em músculo EDL (A) e *soleus* (B) de ratos alimentados e jejuados por 48h. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Sham alimentado. & $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Sham jejum.

4.3.3. Atividades dos sistemas proteolíticos

Em seguida, procedeu-se a investigação de qual(is) sistema(s) proteolítico(s) estaria(m) envolvido(s) no aumento da resposta catabólica induzida pelo jejum em músculos EDL de animais ADMX.

A.1. Sistema dependente de Ubiquitina-Proteassoma

Nesse experimento, avaliou-se especificamente a participação do sistema dependente de Ub-proteassoma no músculo EDL de ratos ADMX, em estado alimentado e jejuado. Como esperado, o jejum resultou na ativação do sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma no músculo EDL de animais do grupo *Sham* (figura 15A). Verifica-se também nesta figura que a depleção da adrenalina, em músculo esquelético de ratos jejuados, promoveu um aumento adicional na atividade desse sistema proteolítico em duas vezes. Por outro lado, verificou-se que a atividade proteolítica dependente de Ub-proteassoma em músculos *soleus* não foi alterada pelo estado do jejum ou pela ADMX (figura 15B).

Estes resultados mostram que o sistema Ub-proteassoma é um dos responsáveis pelo aumento adicional da proteólise observada no músculo EDL de ratos ADMX jejuados. Pode-se também inferir que o músculo *soleus*, ao contrário do EDL, não responde aos efeitos catabólicos do jejum e da ADMX.

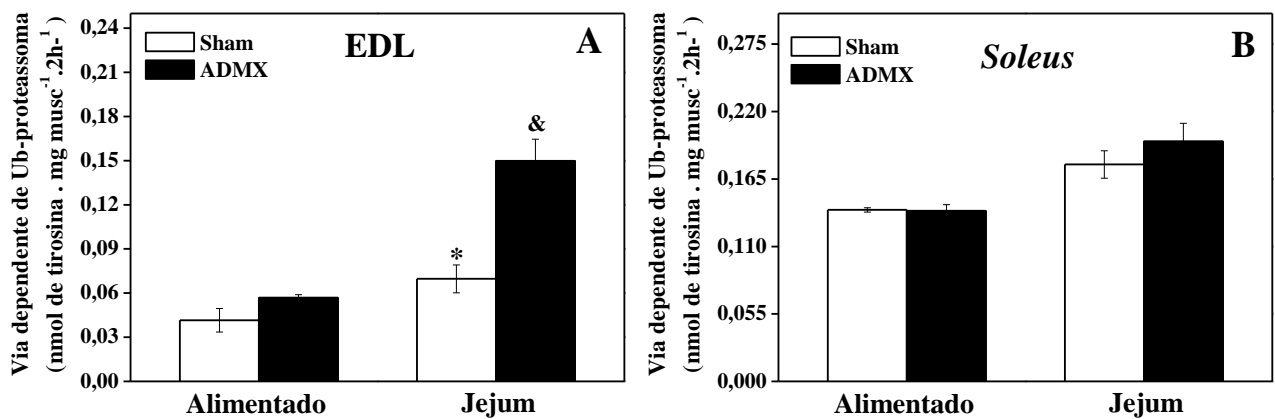


Figura 15. Efeito da adrenalectomia (ADMX) de 10 dias na atividade proteolítica do sistema dependente de ubiquitina(Ub)-proteassoma nos músculos EDL (A) e *soleus* (B) de ratos alimentados e jejuados por 48h. Os valores são expressos como média ± EPM. *p≤0,05 em relação ao grupo Sham alimentado. &p≤0,05 em relação ao grupo Sham jejum.

A.2. Sistema Lisossomal

A figura 16 apresenta os resultados da proteólise lisossomal em músculos de animais ADMX alimentados e jejuados. Verifica-se que esse componente proteolítico não participa do aumento da proteólise total observada em músculos EDL de animais do grupo *Sham* em jejum, como anteriormente demonstrado na figura 14. Contudo, com a remoção da medula da adrenal, este sistema proteolítico foi aumentado em 50% no músculo EDL de animais jejuados (figura 16), quando comparado ao seu respectivo controle. Esses resultados sugerem que o sistema lisossomal, assim como o dependente de Ub-proteassoma, participa do aumento da proteólise total observado no músculo EDL de animais ADMX jejuados (figura 14).

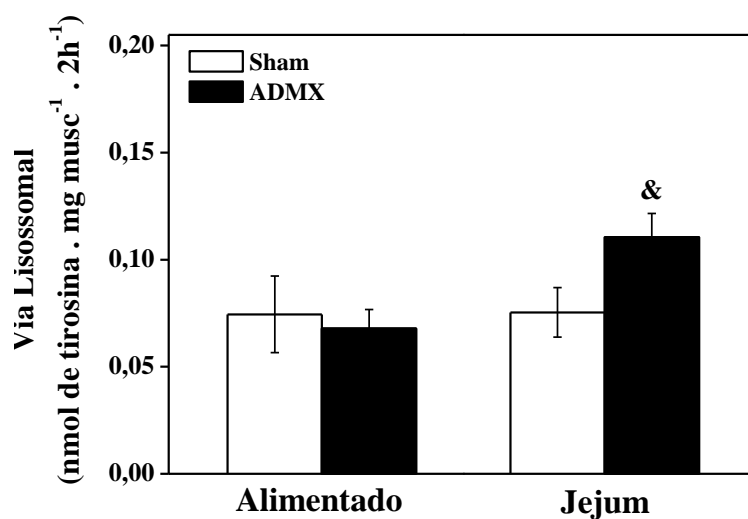


Figura 16. Efeito da adrenalectomia (ADMX) de 10 dias na atividade proteolítica do sistema lisossomal no músculo EDL de ratos alimentados e jejuados por 48h. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* jejum.

A.3. Sistema dependente de Cálcio

A figura 17 apresenta os resultados da proteólise dependente de Cálcio de animais ADMX alimentados e jejuados. Verifica-se que a atividade desse componente proteolítico não foi alterada em músculo EDL de animais jejuados e/ou ADMX.

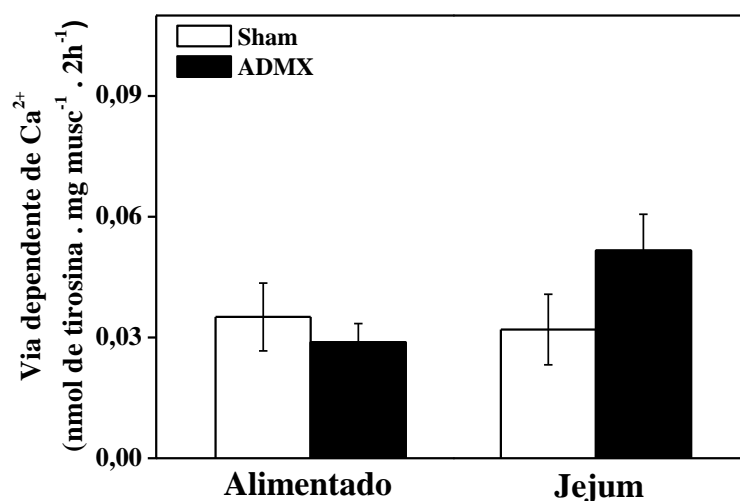


Figura 17. Efeito da adrenalectomia (ADMX) de 10 dias na atividade proteolítica do sistema dependente de Cálcio em músculos EDL de ratos alimentados e jejuados por 48h. Os valores são expressos como média \pm EPM.

4.3.3. Expressão dos atrogenes

Tendo sido observada hiperativação dos sistemas proteolíticos lisossomal e dependente de Ub-proteassoma em músculos EDL de ratos jejuados ADMX, o presente trabalho passou a investigar as alterações que estariam ocorrendo na expressão gênica de diferentes componentes desses sistemas.

A figura 18 apresenta os resultados da expressão dos RNAm da atrogina-1 (figura 18A) e da MuRF1 (figura 18B) no músculo EDL de ratos ADMX alimentados e jejuados. Como esperado, o jejum aumentou ($\sim 7x$) a expressão gênica da atrogina-1 (figura 18A) e da MuRF1 (figura 18B) no músculo EDL de animais do grupo *Sham*. A depleção plasmática da adrenalina levou a um aumento adicional da expressão gênica tanto da atrogina-1 (figura 18A) como da MuRF1 (figura 18B) em aproximadamente três vezes, no músculo EDL de animais jejuados.

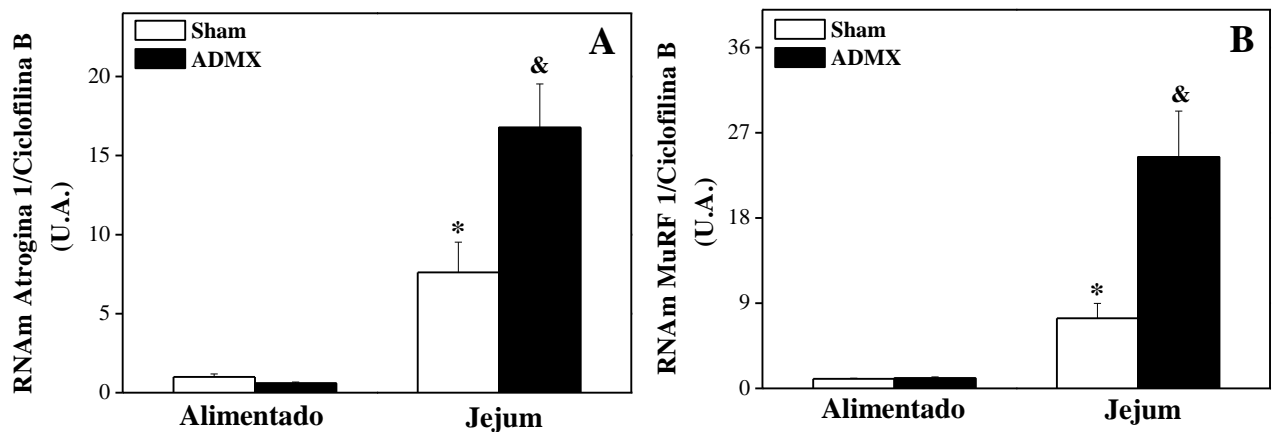


Figura 18. Efeito da adrenalectomia (ADMX) de 10 dias na expressão dos RNAm da atrogina-1 (A) e MuRF1 (B) no músculo EDL de animais alimentados e jejuados por 48h. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=7). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* alimentado. & $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* jejum. U.A.: unidades arbitrárias.

A figura 19 mostra a expressão dos RNAm de dois genes autofágicos (LC3 e GABARAP) responsáveis pela macroautofagia, uma das vias de degradação associadas ao processo lisossomal no músculo esquelético. Verifica-se nesta figura que o jejum aumentou a expressão gênica da LC3 (~2x) e da GABARAP (~3x) no grupo *Sham* e que a ADMX causou um aumento adicional na expressão dos RNAm da LC3 (~5x) e da GABARAP (~4x) no músculo EDL de animais jejuados.

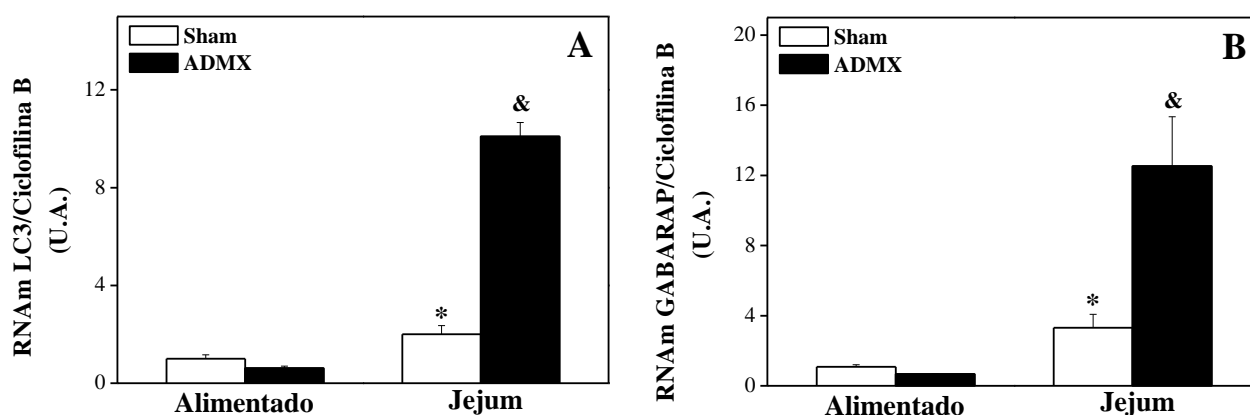


Figura 19. Efeito da adrenalectomia (ADMX) de 10 dias na expressão dos RNAm da LC3 (A) e GABARAP (B) no músculo EDL de animais alimentados e jejuados por 48h. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=7). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* alimentado. & $p \leq 0,05$ em relação ao grupo *Sham* jejum. U.A: unidades arbitrárias.

4.3.4. Efeito da ADMX na fosforilação da Akt no músculo esquelético

Para avançar no conhecimento das vias de sinalização intracelulares envolvidas com a resposta catabólica induzida pela ADMX no metabolismo protéico, analisou-se no músculo tibial anterior de ratos adultos os níveis de fosforilação da Akt, uma proteína chave no controle da síntese e da degradação protéica dependente de Ub-proteassoma. A Akt, quando fosforilada, por hormônios anabólicos, como a insulina, por exemplo, torna-se ativa estimulando a síntese protéica e inibindo a degradação de proteínas. Como pode ser observado na figura 20, houve uma tendência de queda na fosforilação da Akt em músculos de ratos *Sham* em jejum, mas que não foi estatisticamente significativa. A depleção da adrenalina em animais alimentados não alterou a fosforilação da Akt. No entanto, em ratos jejuados, a ADMX reduziu em 35% a fosforilação desta proteína sugerindo o envolvimento da via de sinalização da Akt no efeito anticatabólico da adrenalina no controle do metabolismo de proteínas musculares no jejum.

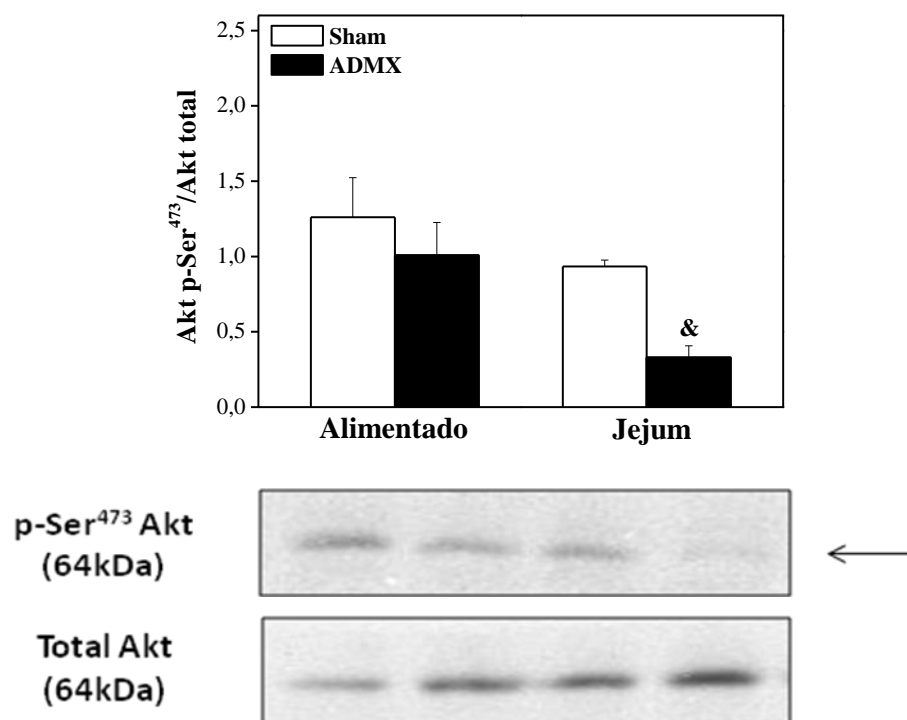


Figura 20. Efeito da adrenodemedulação (ADMX) de 10 dias na fosforilação da Akt no músculo EDL de animais alimentados e jejuados por 48h. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=7) da forma fosforilada em relação ao conteúdo total da proteína. &p \leq 0,05 em relação ao grupo *Sham* jejuado. A seta indica a proteína Akt fosforilada em Ser⁴⁷³ nos diferentes grupos experimentais.

5.0. Discussão

Estudos anteriores de nosso laboratório demonstraram aumento da proteólise e redução da síntese protéica (NAVEGANTES et al., 2002) em músculos esqueléticos isolados de ratos alimentados simpatectomizados quimicamente, sendo esses efeitos revertidos pelo tratamento *in vitro* com adrenalina, agonistas beta-adrenérgicos ou dibutyryl AMPc (NAVEGANTES et al., 2001). A partir dessas evidências experimentais propusemos que o SNS, em situações basais, exerce um tônus anabólico na massa muscular esquelética. Uma vez que o tratamento utilizado para a indução da simpatectomia reduziu tanto as concentrações plasmáticas como o conteúdo de noradrenalina nos tecidos, não foi possível dissociar qual dos dois componentes (hormonal ou neural) do simpático seria o principal mediador desta ação adrenérgica na musculatura esquelética e a eventual importância fisiológica desta ação anabólica em situações de demanda energética. Dando continuidade a esses estudos, o presente trabalho teve como objetivo principal investigar o papel fisiológico da adrenalina plasmática no controle do metabolismo de proteínas musculares no jejum. Para tanto, o modelo experimental utilizado foi o da adrenomedulação (ADMX) em ratos privados de alimentos por dois dias. A principal vantagem na utilização da ADMX como técnica de desnervação simpática consiste na rápida remoção da influência das catecolaminas plasmáticas e, mais especificamente da adrenalina, sem que haja alteração das concentrações de noradrenalina no músculo esquelético.

Inicialmente, padronizou-se o modelo da ADMX quantificando-se as concentrações plasmáticas das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e de outros hormônios e metabólitos em animais alimentados e jejuados, 10 dias após a remoção cirúrgica da medula adrenal. A simpatectomia induzida pela ADMX foi comprovada pela depleção das concentrações plasmáticas de adrenalina e redução dos níveis circulantes de noradrenalina (figura 4). A concentração de noradrenalina ainda presente no plasma de animais ADMX

pode ser decorrente do extravasamento da fenda sináptica após sua liberação pelas terminações simpáticas que inervam os diferentes tecidos periféricos. Embora seja bem conhecido que a hipoglicemia alimentar em humanos leva ao aumento da secreção hormonal de catecolaminas, principalmente de adrenalina (GERISH et al., 1979), as concentrações das catecolaminas plasmáticas não foram alteradas pelo jejum em nossos animais (figura 4). Este fato pode ser explicado pela alta variabilidade dos resultados obtidos devido o estresse, uma vez que a coleta do plasma foi feita após a decapitação dos animais no momento do sacrifício.

Como observado por Navegantes et al. (1999) em ratos simpatectomizados pelo tratamento com guanetidina, a ADMX por 10 dias não alterou o crescimento corporal, a massa dos músculos estudados e nem a glicemia. Como esperado, a remoção do alimento por dois dias resultou em hipoglicemia e reduziu em ~20g a massa corporal dos animais adultos do grupo *Sham* (figura 3), sendo esta alteração resultante de uma redução da massa muscular esquelética (figuras 8 e 12) e do tecido adiposo branco (TAB) (figura 6). Além disso, o jejum aumentou a concentração plasmática de corticosterona, sendo esta resposta semelhante em animais *Sham* e ADMX (tabela 6). Este resultado indica que a incisão cirúrgica no córtex da adrenal feita para a remoção da porção medular a 10 dias não altera a secreção dos glicocorticóides em animais alimentados ou jejuados. É bem conhecido que o jejum é um potente estímulo para a secreção dos glicocorticóides, os quais são responsáveis em aumentar a degradação e reduzir a síntese de proteínas musculares, aumentando o afluxo de aminoácidos para a gliconeogênese hepática e promovendo a maior oferta de substratos energéticos alternativos para os tecidos periféricos. Os glicocorticóides estimulam a gliconeogênese hepática mediante o aumento da atividade de enzimas chaves como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), que catalisa a conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato, e a glicose-6-fosfatase que converte a glicose-6-fosfato em glicose. Além

disso, promovem inibição da síntese protéica e estimulam a atividade do sistema Ub-proteassoma aumentando a proteólise muscular.

O jejum também resulta em redução dos níveis plasmáticos de insulina e aumento da secreção de glucagon e das catecolaminas plasmáticas. Todas essas alterações hormonais contribuem para o aumento da glicogenólise e redução da síntese do glicogênio e podem explicar a redução do conteúdo de glicogênio tecidual (fígado e músculo) observada no presente estudo em animais *Sham* em jejum (figura 5A e B). É bem sabido que o glucagon e a adrenalina estimulam a enzima glicogênio fosforilase no fígado e inibem a glicogênio sintase, promovendo a redução do glicogênio hepático a glicose-6-fosfato e liberando a glicose livre para tecidos (por exemplo, cérebro) que só utilizam essa hexose como fonte energética. Dessa maneira, os efeitos glicogenolíticos da adrenalina no fígado poderiam explicar o discreto aumento do conteúdo de glicogênio hepático observado no grupo ADMX jejum quando comparado ao grupo *Sham* jejum (figura 5B). No músculo, a adrenalina também estimula a glicogenólise muscular aumentando o conteúdo de lactato que pode ser utilizado tanto pelo próprio músculo como liberado para circulação sanguínea aumentando o afluxo deste para a gliconeogênese hepática. Portanto, o maior consumo de lactato resultou em redução dos seus níveis plasmáticos observada nos animais *Sham* em jejum (tabela 6). Experimentos anteriores de nosso laboratório demonstraram em um modelo de hiperatividade simpática induzida pela administração central de carbacol que a ADMX previne o aumento do lactato plasmático em animais alimentados (BRITO et al., 1993; MIGLIORINI et al., 1997), sugerindo fortemente que a adrenalina, secretada pela medula da adrenal, é a principal responsável pela ativação da glicogenólise muscular nessa situação experimental. Corroborando esses estudos, nossos dados mostram redução da lactacidemia nos animais alimentados ADMX quando comparados ao grupo *Sham* (tabela 6).

Com relação ao metabolismo de lipídios no jejum, a adrenalina circulante e a baixa concentração de insulina resultam na inibição da lipogênese e ativação da enzima lipase hormônio-sensível (LHS) estimulando a lipólise. Com isso, ocorre quebra dos triacilgliceróis e aumento da mobilização de glicerol e ácidos graxos livres (AGL), como pode ser constatado pelo aumento dos níveis plasmáticos de AGL (figura 7) e, indiretamente, pela redução da massa do TAB retroperitoneal nos animais jejuados (figura 6A). Uma vez que a adrenalina é um hormônio lipolítico, o esperado era que a massa do TAB aumentasse com a ADMX. Entretanto, a retirada da medula da adrenal reduziu a massa do TAB retroperitoneal e epididimal em animais alimentados e causou uma redução adicional nas massas desses tecidos após o jejum (figura 6A e B). Em conjunto com essas alterações no TAB foi encontrado um aumento nos níveis plasmáticos de AGL em ratos ADMX alimentados (figura 7). Sabendo-se que a lipólise no TAB é regulada por uma inervação simpática direta (FRASON, 2010), cuja atividade é aumentada pelo jejum de 2 dias (MIGLIORINI et al., 1997), nossa hipótese é que a ADMX leve a um aumento compensatório da atividade neural simpática do TAB exacerbando a resposta lipolítica e a perda de massa nesse tecido. De fato, Takahashi et al. (1993) demonstraram que após a ADMX bilateral ocorre um aumento do *turnover* de noradrenalina no tecido adiposo marrom e pâncreas de ratos alimentados. Futuros experimentos serão realizados em nosso laboratório para confirmar esta hipótese.

Ao contrário de suas ações catabólicas clássicas no controle do metabolismo de carboidratos e lipídios, uma série de evidências experimentais do nosso e de outros laboratórios indicam que as catecolaminas exercem um efeito anabólico no metabolismo de proteínas musculares em animais alimentados. No entanto, não há evidências da literatura acerca do papel fisiológico da adrenalina no metabolismo protéico em situações de demanda energética como o jejum.

5.1. Efeito *in vivo* da ADMX no metabolismo de proteínas

Com este objetivo, investigou-se inicialmente as alterações *in vivo* do metabolismo de proteínas no músculo tibial anterior de ratos adultos, por meio da técnica da microdiálise. A aplicação desta técnica em músculos esqueléticos possibilita que diferentes metabólitos hidrossolúveis, entre eles o aminoácido tirosina, se difundam passivamente do interstício para dentro do fluido de perfusão do cateter e assim possam ser quantificados na solução dialisada. Uma vez conhecido o valor de recuperação (“recovery”) de cada cateter, individualmente, corrigiu-se o valor da concentração da tirosina no dialisado e assim obteve-se o valor de sua concentração no interstício. Dessa forma, tornou-se possível calcular o gradiente I-A (concentração intersticial menos a arterial) de tirosina muscular. Uma vez que a tirosina é um aminoácido que não é sintetizado “*de novo*” e nem catabolizado pelo músculo e que o gradiente I-A de tirosina foi sempre positivo (concentração intersticial maior que a arterial) em todas as condições experimentais, assume-se que a tirosina intersticial está sendo liberada localmente pelo músculo e não provém de outras fontes como intestinos, fígado, etc. Portanto, quanto maior for o gradiente I-A de tirosina muscular encontrado maior será o grau de catabolismo protéico no músculo. Essa técnica tem sido amplamente utilizada em nosso laboratório e foi capaz de estimar, em estudos anteriores, o aumento do catabolismo protéico em diferentes modelos clássicos de atrofia muscular como, por exemplo, na sepse (LIRA et al., 2007), na desnervação atrófica (GONÇALVES et al., dados não publicados) e no diabetes (BAVIERA, 2007). Curiosamente, no presente trabalho, o esperado aumento da resposta catabólica no metabolismo protéico induzido pelo jejum não foi observado nos músculos dialisados, os quais apresentaram gradientes I-A de tirosina semelhantes aos músculos de animais alimentados (dados não apresentados). Uma possível explicação para isso é a baixa sensibilidade do método em detectar pequenas alterações da concentração intersticial de tirosina induzidas pela privação alimentar. Uma outra possibilidade é que possíveis alterações

hemodinâmicas induzidas pelo jejum, como por exemplo uma maior vasodilatação local, possam ter aumentado o *clearance* de tirosina e impossibilitado a detecção de qualquer aumento no interstício provinda do músculo. O catabolismo de proteínas musculares também não foi alterado pela ADMX em animais alimentados (figura 11A). Entretanto, músculos de animais ADMX em jejum apresentaram aumento (~2x) na diferença I-A de tirosina, sendo este aumento proveniente de alterações da concentração intersticial e não arterial deste aminoácido (figura 11B). Considerando que todo aumento na concentração intersticial de tirosina (ou de qualquer outro metabólito liberado pela célula) pode ser influenciado por alterações da microcirculação local, avaliou-se o fluxo sanguíneo muscular e a PAM nos grupos jejum e ADMX jejum. Como pode ser observado nas figuras 9 e 10, nenhum desses parâmetros foi alterado pela ADMX, indicando que o aumento da concentração intersticial de tirosina detectado nos músculos dos animais ADMX jejum não foi decorrente de uma eventual redução do fluxo sanguíneo local, mas sim da maior liberação deste aminoácido pela fibra muscular. Esta liberação pode ser resultante de um aumento da proteólise e/ou da redução da síntese protéica. Em conjunto, estes resultados sugerem que a adrenalina plasmática exerce um papel anabólico no metabolismo de proteínas musculares durante o jejum de dois dias, sendo esta resposta independente de alterações hemodinâmicas. Esta hipótese está de acordo com experimentos de microdiálise nos quais a perfusão de músculos de ratos normais com adrenalina, durante 30 minutos, reduziu temporalmente a concentração de tirosina no dialisado (ROSDAHL et al., 1997) e também com estudos em humanos, nos quais foi demonstrado que a infusão intravenosa de adrenalina promove uma redução de 20% na concentração plasmática de aminoácidos (SHAMOON et al., 1980; MILES et al., 1984; KRAENZLIN et al., 1989), muito provavelmente resultante da menor degradação protéica.

Para a investigação dos mecanismos intracelulares envolvidos na resposta catabólica induzida pela ADMX em músculos de ratos adultos jejuados, reproduziu-se esse modelo

experimental em ratos jovens a fim de se obter músculos de tamanhos adequados para a avaliação da síntese e degradação de proteínas em experimentos *in vitro*.

5.2. Efeito da ADMX na síntese de proteínas musculares

A ação anabólica das catecolaminas no metabolismo de proteínas na musculatura esquelética pode ser resultante tanto do aumento dos processos de síntese protéica, assim como da diminuição da proteólise muscular ou ainda de ambos os processos metabólicos. É muito bem conhecido que a síntese de proteínas na musculatura esquelética é estimulada por diferentes hormônios anabólicos como a insulina, o GH e o IGF. Mas, pouco se sabe a respeito do papel da adrenalina. Ao se ligar ao receptor do tipo tirosino quinase, a insulina induz a autofosforilação deste receptor em resíduos de tirosina e, em seguida, recruta o intermediário intracelular fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K), que por sua vez fosforila e ativa Akt. A Akt fosforilada ativa a mTor que estimula a síntese protéica por ativar dois importantes reguladores, a S6 Kinase ribossomal (S6K1) e o fator de iniciação de eucarióticos 4E (eIF4E) (CSIBI et al., 2008). Como no jejum os níveis de insulina no plasma estão diminuídos e os de corticosterona aumentados, já era de se esperar uma redução da velocidade de incorporação da tirosina marcada em proteínas de músculos EDL e *soleus* do grupo *Sham*. No grupo ADMX, a depleção da adrenalina plasmática e a redução dos níveis circulantes da noradrenalina não alteraram a velocidade de síntese protéica total em ambos os músculos de ratos jejuados, sugerindo que as catecolaminas circulantes não tenham um papel importante no controle da síntese protéica em situações de privação alimentar. Entretanto, a depleção da adrenalina nos músculos EDL e *soleus* de ratos alimentados aumentou a síntese protéica em, aproximadamente 21% (figura 12). Sabendo-se que a adrenalina, via PKA, pode antagonizar passos enzimáticos importantes na cascata da sinalização intracelular da insulina no músculo como, por exemplo, a fosforilação da Akt (BRENNESVIK et al., 2005), uma possibilidade a

ser aventada é que a ADMX tenha facilitado a ação estimulatória da insulina na velocidade de síntese de proteínas musculares no estado alimentado. Por outro lado, pode estar ocorrendo um aumento compensatório da atividade noradrenérgica muscular em resposta à ADMX. Esta hipótese é baseada em estudos anteriores de nosso laboratório (NAVEGANTES et al., 2004) que mostraram uma redução significativa da síntese protéica em músculos *soleus* de ratos tratados com guanetidina, sendo este efeito revertido pelo tratamento *in vitro* com isoproterenol (NAVEGANTES et al., 2004). Resultados semelhantes foram observados em músculos *soleus* de animais submetidos à remoção cirúrgica do segmento lombar simpático (responsável pela inervação direta dos músculos da pata posterior), mas não em animais adrenodemedulados por 4 dias. Sendo assim, pode-se sugerir que a inervação adrenérgica direta, e não a adrenalina circulante parece ser o componente do SNS responsável pela ação estimulatória dos processos de síntese de proteínas na musculatura esquelética do rato.

5.3. Efeito da ADMX na degradação de proteínas musculares

A etapa seguinte do presente estudo teve como objetivo investigar se a ADMX alterava a degradação de proteínas totais. Como esperado, a degradação total de proteínas foi aumentada em 50% pelo jejum no músculo EDL (figura 14A), mas não no músculo *soleus* (figura 14B). Em vários estados catabólicos, incluindo o jejum (LI et al., 1977; WING et al., 1995), o tratamento com glicocorticóides (WING et al., 1993) e a acidose (MITCH et al., 1994), existe uma maior atrofia muscular no EDL do que no *soleus*. De fato, músculos vermelhos, constituídos por fibras do tipo I, de metabolismo predominantemente oxidativo como o *soleus*, são menos responsivos aos sinais catabólicos sistêmicos quando comparados a músculos brancos glicolíticos, ricos em fibras do tipo II como o EDL. A razão para isto ainda não é totalmente conhecida, mas parece ser devido à maior expressão de PGC1-alfa, um

coativador transcricional envolvido na supressão da expressão das E3 ligases, em músculos tipicamente oxidativos (SANDRI et al., 2006).

A depleção da adrenalina promoveu um aumento adicional na degradação total de proteínas no músculo EDL de ratos com privação nutricional (figura 14A). Corroborando os resultados de Baviera et al. (2008) que observaram um aumento da proteólise total em músculo EDL de ratos diabéticos tratados com guanidina durante 1 e 3 dias. Resposta oposta ocorre quando músculos de ratos normais são incubados na presença do isoproterenol (agonista adrenérgico do tipo β), como observado por Navegantes et al. (2000).

Para saber qual(is) sistema(s) proteolítico(s) estaria(m) envolvido(s) com o aumento da proteólise total no músculo EDL de ratos jejuados ADMX observado nesse estudo, procedeu-se a investigação da atividade dos diferentes sistemas proteolíticos. Embora se tenha demonstrado previamente que a atividade proteolítica dependente de Cálcio é diretamente regulada pelas catecolaminas em situações basais, aumentando transitoriamente em resposta à simpatectomia aguda (NAVEGANTES et al., 1999) e reduzindo após o tratamento com beta-agonistas (NAVEGANTES et al., 2001), isto aparentemente não parece ocorrer no jejum. Como pode ser observado na figura 17, o sistema proteolítico dependente de Cálcio não teve sua atividade alterada em músculos EDL e *soleus* de ratos jejuados e/ou ADMX. Atualmente, acredita-se que as calpaínas têm sua atividade aumentada nas fases iniciais da atrofia muscular, desestruturando o sarcômero ao nível das linhas Z. Esta ação parece ser importante para a liberação das proteínas miofibrilares no citosol, as quais seriam degradadas pelo sistema dependente de Ub-proteassoma (DELGADO et al., 2001). A hipótese é que a atividade do sistema dependente de Cálcio esteja normalizada no jejum de 48 horas ou que outras proteínas atroficas como, por exemplo, a MuRF1, estejam atuando no sarcômero desestruturando as proteínas miofibrilares como demonstrado por Cohen et al. (2009) em ratos desnervados. Corroborando a hipótese, Clarke et al. (2007) demonstraram em culturas

de células tratadas com dexametasona que a degradação da cadeia pesada de miosina é dependente de MuRF-1. Experimentos adicionais serão necessários para esclarecer se a ADMX pode alterar a atividade do sistema proteolítico dependente de Cálcio em períodos mais curtos do jejum. Já é bem descrito na literatura que o sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma é o principal responsável pela degradação de grande parte das proteínas miofibrilares durante o jejum (KETTELHUT et al., 1994). De fato, o presente estudo mostra um aumento de, aproximadamente, 66% na atividade proteolítica desse sistema em músculos EDL de ratos *Sham* jejuados (figura 15), sendo esta resposta proteolítica exacerbada em 115% nos músculos de animais submetidos à ADMX. Estes resultados estão em perfeito acordo com os estudos de Baviera et al. (2008) que demonstraram um aumento adicional da atividade do sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma em músculos EDL de animais diabéticos submetidos à simpatectomia química.

Sabe-se que a maior atividade do proteassoma em músculos de animais sob privação alimentar é acompanhada pelo aumento do conteúdo de proteínas poliubiquitinadas (LECKER et al., 1999; SOLOMON et al., 1998), sendo esta resposta totalmente bloqueada pela adrenalectomia (WING & GOLDBERG, 1993), o que evidencia a importância dos glicocorticóides para a mobilização de proteínas no estado do jejum. O aumento do processo de ubiquitinação em diferentes situações atroficas, incluindo o jejum, é dependente da hiperexpressão das E3 ligases, atrogina-1 e MuRF1 (SACHECK et al., 2007), as duas principais proteínas envolvidas no reconhecimento dos substratos protéicos a serem degradados pelo proteassoma. Em total concordância com prévios estudos da literatura, observou-se no presente trabalho um aumento de aproximadamente oito vezes na expressão gênica da atrogina-1 e MuRF1 em músculo EDL de ratos jejuados. Acompanhando o que aconteceu com a atividade do sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma, a ADMX causou um aumento adicional de quatro vezes na expressão do RNAm de ambas as E3 ligases

em músculos de animais jejuados. Estes resultados corroboram os estudos de Gonçalves et al. (2009) que demonstraram que uma única injeção de clenbuterol, 4 horas antes, reduziu a hiperexpressão gênica e protéica da atrogina-1 e MuRF1 em músculo gastrocnêmio de camundongos jejuados por 48h. Kline et al. (2007) também observaram uma redução da expressão protéica das E3 ligases em músculos de ratos após tratamento com clenbuterol por 3, 7 e 14 dias. Conjuntamente, esses resultados sugerem que a adrenalina exerce um controle inibitório da atividade do sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma, suprimindo a expressão gênica das E3 ligases durante o jejum.

O último sistema proteolítico avaliado em músculo EDL de ratos ADMX alimentados e jejuados foi o lisossomal. Como esperado, o estado de jejum não alterou a atividade proteolítica do sistema lisossomal (figura 16). De forma semelhante ao que foi observado no sistema Ub-proteassoma, nossos resultados mostram que quando as concentrações plasmáticas da adrenalina são depletadas pela ADMX, a atividade do sistema lisossomal aumenta em 50% no músculo EDL de ratos jejuados. Baviera et al. (2008) também não observaram qualquer alteração do sistema lisossomal quando o diabetes ou a simpatectomia eram estudados isoladamente. No entanto, houve uma hiperativação deste sistema proteolítico em animais diabéticos simpatectomizados. Estes resultados indicam que as catecolaminas e a insulina exercem ações inibitórias comuns na regulação dos sistemas lisossomal e dependente de Ub-proteassoma podendo um hormônio compensar o efeito antiproteolítico do outro em um quadro de deficiência hormonal de um deles. Para uma melhor compreensão do papel da adrenalina no controle da via lisossomal/autofágica no músculo esquelético em situação de privação nutricional, procedeu-se a investigação da expressão gênica dos genes autofágicos, LC3 e GABARAP. Embora não tenhamos detectado alterações na atividade do sistema lisossomal em animais *Sham* jejuados, a expressão do RNAm da LC3 e GABARAP no músculo EDL foi aumentada em duas e três vezes, respectivamente. Esses achados estão de

acordo com os estudos de Mammucari et al. (2007) que demonstraram a indução da transcrição dos genes relacionados à autofagia em músculo esquelético de camundongos CD1 com 1 dia de jejum. A ausência da adrenalina no jejum aumentou tanto o RNAm da LC3 (5x) como da GABARAP (4x) no músculo EDL (figura 19), sugerindo um importante papel fisiológico da adrenalina no controle inibitório tanto da atividade do sistema lisossomal como da expressão dos genes autofágicos, durante o jejum.

Em paralelo ao aumento da expressão do RNAm dos atrogenes e das atividades dos sistemas proteolíticos Ub-proteassoma e lisossomal, observou-se neste trabalho uma redução da fosforilação da Akt no músculo tibial anterior de ratos ADMX jejuados (figura 20). Estes resultados sugerem que a Akt seja um alvo de fosforilação da ação da adrenalina e estão de acordo com os dados de Brennesvik et al. (2005) que demonstraram pela primeira vez o *cross-talk* entre as sinalizações da insulina e das catecolaminas na musculatura esquelética. Nesses estudos, a adrenalina foi capaz de potencializar o efeito da insulina na fosforilação da Akt em *soleus* incubados na presença dos dois hormônios. Resultados semelhantes foram observados pelo mesmo grupo, onde músculos *soleus* e *epitrochearis* de ratos infundidos durante 1 dia com adrenalina e incubados na presença de insulina apresentaram uma elevação adicional nos níveis de fosforilação da Akt em comparação aos animais controles infundidos somente com ácido ascórbico (JENSEN et al., 2005). Kline et al. (2007) e Gonçalves et al (2009) também demonstraram um aumento da fosforilação da Akt nos músculos gastrocnêmio e tibial anterior de roedores após 2 e 4h de uma única injeção de clenbuterol. Mais recentemente, estudos de nosso laboratório (BAVIERA et al, 2009) também demonstraram que a indução da fosforilação da Akt promovida pela insulina em músculos EDL isolados pode ser potencializada pela adrenalina, DB-AMPC (análogo sintético do AMPC) e por um agonista seletivo da Epac (do inglês, Exchange protein directly activated by cAMP). Mei et al. (2002) já haviam demonstrado que o aumento das concentrações

intracelulares de AMPc promovido pela adição de forskolina (ativador da adenilato ciclase) ou DB-AMPc, em cultura de células HEK 293, ativa a Epac, sendo esta proteína capaz de aumentar os níveis de fosforilação (e conseqüentemente ativação) da Akt, possivelmente através de um mecanismo que envolve a participação de Rap1 e PI3K. Estes resultados, em conjunto, sugerem que a Akt é um dos pontos de *cross-talk* entre as sinalizações da insulina e da adrenalina no controle inibitório dos sistemas proteolíticos. Os dados do presente estudo nos permitem concluir que a depleção das catecolaminas plasmáticas, principalmente a adrenalina, amplifica os efeitos catabólicos induzidos pelo jejum na ativação dos sistemas proteolíticos em músculos EDL de ratos. A Figura 21 apresenta de uma forma resumida os possíveis mecanismos pelos quais estes sistemas proteolíticos poderiam ser regulados pelas catecolaminas no jejum. A adrenalina liberada pela medula adrenal durante o jejum liga-se diretamente a adrenoceptores beta-2 presentes no músculo e ativa uma cascata de fosforilações dependente do AMPc com conseqüente ativação da Epac e da Akt. A Akt fosforilada promove a inativação de FoxO3 por fosforilação direta e com isso reduz a hiperexpressão dos atrogenes e da atividade dos sistemas proteolíticos lisossomal/autofágico e Ub-proteassoma. De acordo com esta hipótese, esta ação adrenérgica seria fisiologicamente importante para atenuar os efeitos catabólicos deletérios induzidos pela privação alimentar no balanço protéico da musculatura esquelética.

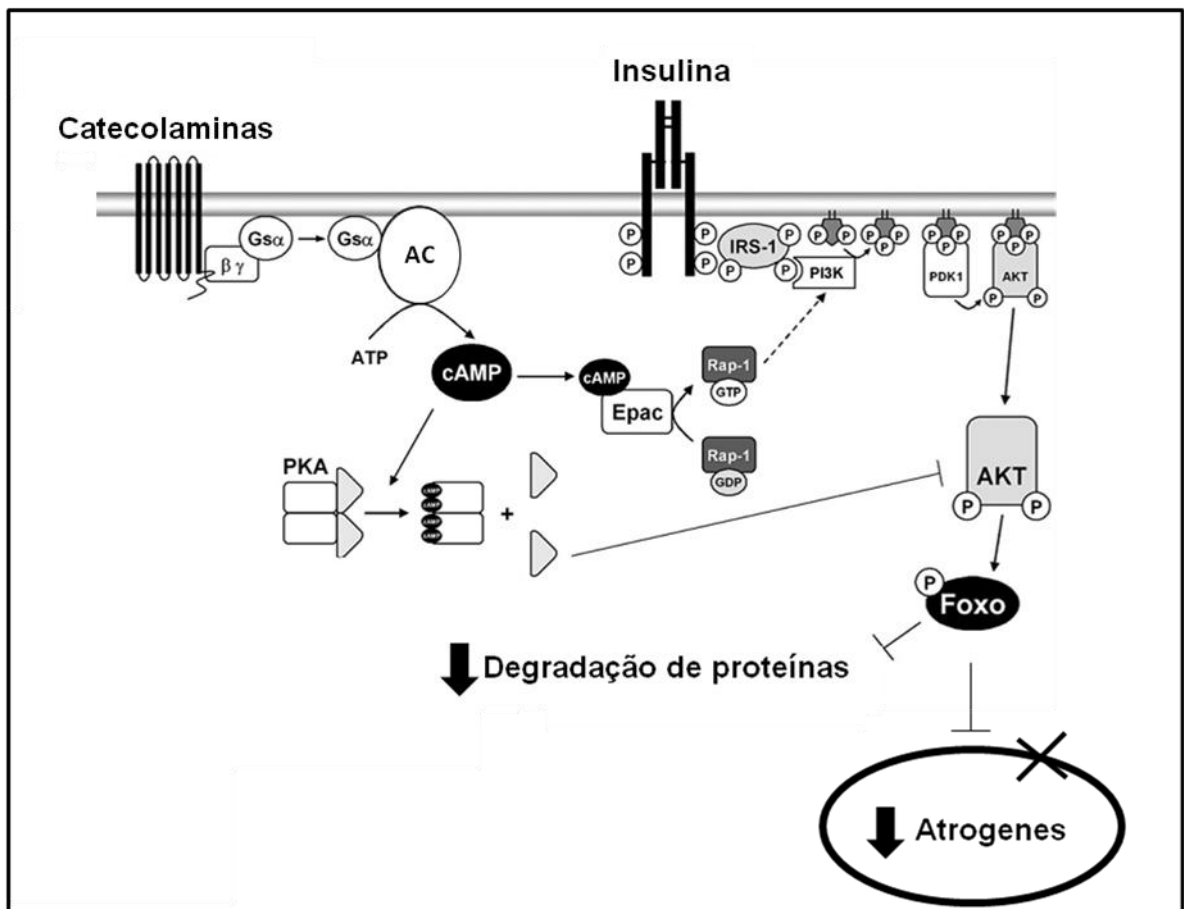


Figura 21. *Cross-talk* entre os intermediários da sinalização da insulina e das catecolaminas que podem ser responsáveis pelo controle dos sistemas proteolíticos e da expressão dos atrogenes. Modificado de Baviera et al., 2009.

6.0. Referências Bibliográficas

BARTOLI, M.; BOURG, N.; STOCKHOLM, D.; RAYNAUD, F.; DELEVACQUE, A.; HAN, Y.; BOREL, P.; SEDDIK, K.; ARMANDE, N.; RICHARD, I. A mouse model for monitoring calpain activity under physiological and pathological conditions. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 51, p. 39672-29680, 2006.

BAVIERA, A.M. Papel das catecolaminas e do AMP cíclico no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos diabéticos. Ribeirão Preto, 2007. 183p. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

BAVIERA, A.M.; ZANON, N.M.; NAVEGANTES, L.C.; KETTELHUT, I.C. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 315, p. 104-112, 2009.

BAVIERA, A.M.; ZANON, N.M.; NAVEGANTES, L.C.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Chemical sympathectomy further increases muscle protein degradation of acutely diabetic rats. **Muscle Nerve**, v. 38, n. 2, p. 1027-1035, 2008.

BECHET, D.; TASSA, A.; TAILLANDER, D.; CONABRET, L.; ATTAIX, D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.37, p. 2098-2114, 2005.

BODINE, S.C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V.K.M.; CLARKE, B.A.; POUYMIROU, W.T.; PANARO, F.J.; NA, E.; PHARMARAJAN, K.; PAN, Z.; VALENZUELA, D.M.; DECHIARA, T.M.; STITT, T.N.; YANCOPOULOS, G.D.; GLASS, D.J. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704-1708, 2001.

BORLAND, G.; SMITH, B.O.; YARWOOD, S.J. EPAC proteins transducer diverse cellular actions of cAMP. **Br. J. Pharmacol.** v. 158, p. 70-86, 2009.

BOS, J.L.; DE ROOIJ, J.; REEDQUIST, K.A. Rap1 signalling: adhering to new models. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 2, n. 5, p. 369-377, 2001.

BOSSOLA, M.; PACELLI, F.; TORTORELLI, A.; ROSA, F.; DOGLIETTO, G.G.B. Skeletal muscle in câncer cachexia: the ideal target of drug therapy. **Curr. Cancer Drug Targets.** v. 8, n. 4, p. 285-298, 2008.

BRENNESVIK, E.O.; KTORI, C.; RUZZIN, J.; JEBENS, E.; SHEPHERD, P.R.; JENSEN, J. Adrenaline potentiates insulin-stimulated PKB activation via cAMP and Epac: implications for cross-talk between insulin and adrenaline. **Cell. Signal.**, v. 17, n. 12, p. 1551-1559, 2005.

BRITO, N.A.; BRITO, M.N.; KETTELHUT, I.C.; MIGLIORINI, R.H. et al. Intra-ventromedial hypothalamic injection of cholinergic agents induces rapid hyperglycemia, hyperlactatemia and gluconeogenesis activation in fed, conscious rats. **Brain Res.**, v.626; p.339-42, 1993.

CARAFOLI, E.; MOLINARI, M. Calpain: a protease in search of a function? **Cell. Metabolism.** v. 247, n. 2, p. 193-203, 1998.

CARROL, N. V., LONGLAY, R. W., ROE, J. H. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 220, p. 583-593, 1956.

CHENG, S.; JI, Z.; TSALKOVA, T.; MEI, F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 40, p. 561-662, 2008.

CLARKE, B.A.; DRUJAN, D.; WILLIS, M.S.; MURPHY, L.O.; CORPINA, R.A.; BUROVA, E.; RAKHILIN, S.V.; STITT, T.N.; PATTERSON, C.; LATRES, E., GLASS, D.J. The E3 ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. **Cell. Metabolism.**, n.6, 376-385, 2007.

COHEN, S.; BRAULT, J.J.; GYGI, S.P.; GLASS, D.J.; VALENZUELA, D.M.; GARTNER, C.; LATRES, E. GOLDBERG, A.L. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. **J. Cell. Biol.**, v. 185, n.6, p. 1083-1095, 2009.

CSIBI, A.; TINTIGNAC, L.A.; LEIBOVITCH, M.P.; LEIBOVITCH, S.A. eIF3-f function in skeletal muscles. **Cell. Cycle.**, v. 7, n. 12, p.1698-1701, 2008.

DELGADO, E.F.; GEESINK, G.H.; MARCHELLO, J.A.; GOLL, D.E.; KOOHMARAIE, M. Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep. **J. Anim. Sci.**, v. 79, n. 8, p. 2097-2107, 2001.

DE ROOIJ, J.; ZWARTKRUIS, F.J.T.; VERHEIJEN, M.H.G.; COOL, R.H.; NIJMAN, S.M.B.; ITTINGHOFFER, A. Epac is a Rap1 guanine nucleotide-exchange factor directly activated by cyclicAMP. **Nature**, v. 396, n. 6710, p. 474-477, 1998.

FRASSON, D. Papel do sistema nervoso simpático no controle das vias de geração de glicerol-3-fosfato no tecido adiposo epididimal de ratos. Ribeirão Preto, 2010. 135p. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

FINN, P.G.; DICE, J.F. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. **Nutrition.**, v. 22, n.7-8, p. 830-844, 2006.

FULKS, R.M.; LI, J.B.; GOLDBERG, A.L. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 290-298, 1975.

GENG, J.; KLIONSKY, D.J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. **EMBO reports.** v. 8, p. 859-864, 2008.

GERISH, J.; DAVIS, J.; LORENZI, M. Hormonal mechanisms of recovery from insulin-induced hypoglycemia in man. **Am. J. Physiol.**, n. 236, p. E380-E385, 1979.

GILSBACH, R.; HEIN, L. Presynaptic metabotropic receptors for acetylcholine and adrenaline/noradrenaline. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 184, p. 261-288, 2008.

GLASS, D.J. Signaling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **Nature.** v. 5, p. 87-90, 2003.

GOLL, D.E.; DAYTON, W.R.; ROBSON, R.M. Studies of the α -actinin/actin interaction in the Z-disc by using calpain. **J. Biol. Chem.** v. 266, p. 8501-8510, 1991.

GOMES, M.D.; LECKER, S.H.; JAGOE, R.T.; NAVON, A.; GOLDBERG, A.L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **PNAS**, v. 98, n. 25, p. 14440-14445, 2001.

GONÇALVES, D.A.; LIRA, E.C.; BAVIERA, A.M.; CAO, P.; ZANON, N.M.; ARANY, Z.; BEDARD, N.; TANKSALE, P.; WING, S.S.; LECKER, S.H.; KETTELHUT, I.C.; NAVEGANTES, L.C. Mechanisms involved in 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 150, n. 12, p. 5395-5404, 2009.

HUBER, K.; KALCHEIM, C.; UNSICKER, K. The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 151, p.10-16, 2009.

JAGOE, R.T.; GOLDBERG, A.L. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 4, n. 3, p. 183-190, 2001.

JEFFERSON, L.S.; KIMBALL, S.R. Translational control of protein synthesis: implications for understanding changes in skeletal muscle mass. **Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.**, v. 11, p. 143-149, 2001.

JENSEN, J.; RUZZIN, J.; JEBENS, E.; BRENNESVIK, E.O.; KNARDAHL, S. Improved insulin-stimulated glucose uptake and glycogen synthase activation in rat skeletal muscles after adrenaline infusion: role of glycogen content and PKB phosphorylation. **Acta. Physiol. Scand.**, v.184, n. 2, p. 121-30, 2005.

KETTELHUT, I.C. Regulação da degradação de proteínas em músculo esquelético. Ribeirão Preto, 1994. 171p. **Tese (Livre Docência)** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

KETTELHUT, I.C.; WING, S.S.; GOLDBERG, A.L. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. **Diabetes Metab. Rev.**, v. 4, n. 8, p. 751-72, 1988.

KETTELHUT, I.C.; PEPATO, M.T.; MIGLIORINI, R.H.; GOLDBERG, A.L. Regulation of different proteolytic pathways in skeletal muscle in fasting and diabetes mellitus. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 981-993, 1994.

KLINE, W.O.; PANARO, F.J.; YANG, H.; BODINE, S.C. Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. **J. Appl. Physiol.**, v. 102, n. 2, p. 740-747, 2007.

KLIONSKY, D.J.; EMR, S.D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v.290, n. 5497, p.1717-1721, 2000.

KOMATSU, M.; WAGURI, S.; UENO, T.; IWATA, J.; MURATA, S.; TANIDA, I.; EZAKI, H.J.; MIZUSHIMA, N.; OHSUMI, Y.; UCHIYAMA, Y. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. **J. Cell. Bio.**, v. 169, p. 425-434, 2005.

KRAENZLIN, M.E.; KELLER, A.; THÉLIN, A.; ARNAUD, M.J.; ATAUFFACHER, W. Elevation of plasma epinephrine concentrations inhibits proteolysis and leucine oxidation in man via β -adrenergic mechanisms. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 388-393, 1989.

KRAWIEC, B.J. et al. Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 289, p. 969-980, 2005.

KRSTULOVIC, A.M. Investigations of catecholamines metabolism using high performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 35, p. 207-210, 1982.

KUMA, A.; HATANO, M.; YAMAMOTO, A.; NAKAYA, H.; YOSHIMORI, T.; OSHUMI, Y.; TOKUHISA, T.; MIZUSHIMA, N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. **Nature**. v. 432, p. 1032-1036, 2004.

LECKER, S.H.; SOLOMON, V.; PRICE, S.R.; TAE KWON, Y.; MITCH, H.E.; GOLDBERG, A.L. Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. **J. Clin. Invest.**, v. 104, n. 10, p. 1411-1420, 1999.

LEDUC, J. Catecholamine production and release in exposure and acclimation to cold. **Acta Physiol. Scand.**, Suppl 183, p. 1-101, 1961.

LI, J.B.; GOLDBERG, A.L. Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. **Am. J. Physiol.**, v. 231, p. 441-448, 1976.

LI, J.; JEFFERSON, L.S. E. Effect of isoproterenol on amino acid levels and protein turnover in skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v.232, p. E243-E249, 1977.

LIRA, E.C.; GRAÇA, F.A.; GONÇALVES, D.A.; ZANON, N.M.; BAVIERA, A.M.; STRINDBERG, L.; LÖNNROTH, P.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C.; NAVEGANTES, L.C.C. Cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase inhibitors reduce skeletal muscle protein catabolism in septic rats. **Shock**, v.27, n.6, p.687-694, 2007.

LÖNNROTH, P.; STRINDBERG, L. Validation of the internal reference technique for calibrating microdialysis catheters *in situ*. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 153, p. 375-80, 1995.

LOWELL, B.B. et al. Evidence that lysosomes are not involved in the degradation of myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. **Biochem. J.**, v. 234, p. 237-240, 1986.

MAMMUCARI, C.; MILAN, G.; ROMANELLO, V.; MASIERO, E.; RUDOLF, R.; DEL PICCOLO, P.; BURDENM S.J.; DI LISI, R.; SANDRI, C.; ZHAO, J.; GOLDBERG, A.L.; SCHIAFFINO, S.; SANDRI, M. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle *in vivo*. **Cell. Metabolism.**, v. 6, p. 458-471, 2007.

MARTINEAU, L.; LITTLE, R.A.; ROTHWELL, N.J.; FISCHER, M.I. Clenbuterol, a β_2 -adrenergic agonist, reverses muscle wasting due to scald injury in the rat. **Burns.**, v. 19, p. 26-34, 1993.

MEI, F.C.; QIAO, J.; TSYGANKOVA, O.M.; MEINKOTH, J.L.; QUILLIAM, L.A.; CHENG, X. Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 11497-11504, 2002.

MILES, J.M.; NISSEN, S.L.; GERICH, J.E.; HAYMOND, M.W. Effects of epinephrine infusion on leucine and alanine kinetics in humans. **Am. J. Physiol.**, v. 257, (Endocrinol Metab), p. E166-E172, 1984.

MIGLIORINI, R.H.; GAROFALO, M.A.R.; KETTELHUT, I.C. Increased sympathetic activity in rat white adipose tissue during prolonged fasting. **Am. J. Physiol.**, v.272, p. R656-R661, 1997.

MITCH, W.E. Cellular mechanisms of catabolism activated by metabolic acidosis. **Blood Purif.**, v.13, n. 6, p. 368-374, 1995.

MIZUSHIMA, N.; YAMAMOTO, A.; MATSUI, M.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. **Mol. Biol. Cell.**, v. 15, p. 1001-1111, 2004.

NAVEGANTES, L.C.C.; RESANO, N.M.Z.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Effect of guaneditine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 5, p. E883-E889, 1999.

NAVEGANTES, L.C.C.; RESANO, N.M.Z.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 279, p. E663-E668, 2000.

NAVEGANTES, L.C.C.; RESANO, N.M.Z.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Catecholamines inhibit Ca²⁺-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through β_2 -adrenoceptors and cAMP. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.281, p. E449-E454, 2001.

NAVEGANTES, L.C.C.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Adrenergic control of protein metabolism in skeletal muscle. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.** v. 5, p. 281-286, 2002.

NAVEGANTES, L.C.C.; RESANO, N.M.Z.; BAVIERA, A.M.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 186, p. 642-647, 2004.

NIXON, R.A. The calpains in aging and aging-related diseases. **Ageing Res. Rev.**, v. 2, n. 4, p. 407-418, 2003.

OHSUMI, Y. Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems. **Nature Reviews Molecular Cell. Biology.**, v. 2, p. 211-216, 2001.

PEPATO, M.T.; MIGLIORINI, R.H. GOLDBERG, A.L.; KETTELHUT, I.C. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. **Am. J. Physiol.**, v.264, p. E340-E347, 1996.

RANNELS, D.E.; KAO, R.; MORGAN, H.E. Effect of insulin on protein turnover in heat muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 1694-1701, 1975.

RAPPAPORT, E.B.; YOUNG, J.B.; LANDSBERG, L. Initiation, duration and dissipation of diet- induced changes in sympathetic nervous system activity in the rat. **Metabolism.**, v. 31, p.v: 143-146, 1982.

RAYNAUD, F.; MARCILHAC, A. Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regularion of Alzheimer'a disease. **FEBS J.**, v. 273, n. 15, p. 3437-3443, 2006.

ROATTA, S.; FARINA, D. Sympathetic actions on the skeletal muscle. **Exerc. Sport. Sci. Rev.**, v. 38, n. 1, p. 31-35, 2010.

ROSCIONI, S.S.; ELZINGA, C.R.; SCHIMIDT, M. Epac: effectors and biological functions. **Naunym Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 377, p. 345-357, 2008.

ROSDAHL, H.; UNGERSTEDT, U.; HENRIKSSON, J. Microdialysis in human skeletal muscle and adipose tissue at low flow rates is possible if dextran-70 is added to prevent loss of perfusion fluid. **Acta. Physiol. Scand.**, v.159, n.3, p.261-2, 1997.

RYALL, J.G.; GREGOREVIC, P.; PLANT, D.R.; SILENCE, M.N.; LYNCH G.S. β_2 - Agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 283, p. R1386-R1394, 2002.

RYALL, J.G.; PLANT, D.R.; GREGOREVIC, P.; SILENCE, M.N.; LYNCH, G.S. β_2 - Agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats. **J. Physiol.**, v. 555, p. 175-188, 2004.

RYALL, J.G.; SILENCE, M.N.; LYNCH, G.S. Systemic administration of β_2 -adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, p. 587-595, 2006.

SANDRI, M.; SANDRI, C.; GILBERT, A.; SKURK, C.; CALABRIA, E.; PICARD, A.; WALSH, K.; SCHIAFFINO, S.; LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L. FoxO transcription factos induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell.**, v.117, p. 399-412, 2004.

SANDRI, M.; JIANDIE, L.; CHRISTOPH, H.; YANG, W.; ARANY, Z.P.; LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L.; SPIEGELMAN, B.M. PCG-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. **PNAS**, v. 103, n. 44, p. 16260-16265, 2006.

SACHEK, J.M.; HYATT, J.P.; RAFFAELLO, A.J.; JAGOE, R.T.; ROY, R.R.; EDGERTON V.R.; LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. **FASEB J.**, v. 21, n. 1, p. 140-155, 2007.

SCHAKMAN, O.; KALISTA, S.; BERTRAND, L.; LAUSE, P.; VERNIERS, J.; KETELSLEGERS, J.M.; THISSEN, J.P. Role of Akt/GSK-3 β /beta-catenin transduction pathway in the muscle anti-atrophy action of insulin-like growth factor-I in glucocorticoid-treated rats. **Endocrinology**, v. 149, p. 3900-3908, 2008.

SCHARFF, R.; WOOL, I.G. Effect of diabetes on the concentration of amino acids in plasma and heart muscle of rats. **Biochem. J.**, v. 99, p. 173-178, 1966.

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

SJÖRGREN, B.; NOERDENSJÖLD, T.; HOLMGEEN, H.; MÖLLERSTRÖM, J.; Beitrag zur Kenntnis der Leberhythmik (glycogen, Phosphor und Calcium in der Kaninchenleber). **Pfügers Arch. Ges. Physiol.**, v. 240. P. 427-436, 1938.

SOLOMON, V.; BARACOS, V.; SARRAF, P.; GOLDBERG, A.L. Rates of ubiquitin conjugation increase when muscles atrophy, largely through activation of the N-end rule pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 13, n. 21, p. 12602-12607, 1998.

SOWERS, J.R. et al. Blood pressure and hormone changes associated with weight reduction in the obese. **Hypertension.**, v. 4. p. 638-691, 1982.

STROBL, S.; FERNANDEZ-CATALAN C, BRAUN M, HUBER R, MASUMOTO H, NAKAGAWA K, IRIE A, SORIMACHI H, BOURENKOW G, BARTUNIK H, SUZUKI K, BODE W. . The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, n. 2, p. 588-592, 2000.

SUZUKI, K.; HATA, S.; KAWABATA, Y.; SORIMACHI, H. Structure, activation, and biology of calpain. **Diabetes.**, v. 53 Suppl 1, p. S12-S18, 2004.

TAKAHASHI, A.; IKARASHI, Y.; ISHIMARU, H.; MARUYAMA, Y. Compensation between sympathetic nerves and adrenalmedullary activity: Effects of adrenalectomy and sympathectomy on catecholamine turnover. **Life Sciences**, v.53, p. 1567-1572, 1993.

TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. LC3 conjugation system mammalian autophagy. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.36, p. 2503-2518, 2004.

TANIDA, I.; MINEMATSU-IKEGUCHI, N.; UENO, T.; KOMINAMI, E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. **Autophagy**, v. 1, n. 2, p. 84-91, 2005.

TANIDA, I.; KOMATSU, M.; UENO, T.; KOMINAMI, E. GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 300, n. 3, p. 637-644, 2003.

TAWA, N.E.; ODESSEY, R.; GOLDBERG, A.L. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. **J. Clin. Invest.**, v.100, n. 1, p. 197-203, 1997.

TIDBALL, J.G.; SPENCER, M.J. Calpains and muscular dystrophies. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 32, p. 1-5, 2000.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

WANG, X.; HU, J.; PRICE, S.R. Inhibition of PI3-kinase signaling by glucocorticoids results in increased branched-chain amino acid degradation in renal epithelial cells. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 292, p. C1874-C1879, 2007.

WAALKES, T.P.; UDENFRIEND, S. A fluorometric method the estimation of tyrosine in plasma and tissues. **J. Lab. Clin. Med.** 1957; 50: 733-736.

WEI, W.; FAREED, M.U.; EVENSON, A.; MENCONI, M.J.; YANG, H.; PETKOVA, V.; HASSELGREN, P.O. Sepsis stimulates calpain activity in skeletal muscle by decreasing calpastatin activity but does not activate caspase-3. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 288, n. 3, p. R580-590, 2005.

WING, S.S.; CHIANG, H.L.; GOLDBERG, A.L.; DICE, J.F.P. Proteins containing peptide sequences related to Lys-Phe-Glu-Arg-Gln are selectively depleted in liver an heart, but not skeletal muscle, of fasted rat. **Biochem. J.**, v. 275, p. 165-169, 1991.

WING, S.S.; GOLDBERG, A.L. Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. **Am. J. Physiol.**, v.264 (Endocrinol Metab.27), p.E668-E676, 1993.

WING, S.S.; HAAS, A.; GOLDBERG, A.L. Increase in ubiquitin-protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation. **Biochem. J.**, v. 307, p. 639-645, 1995.

YAN ,L.; VATNER, D.E.; KIM, S.J.; GE, H.; MASUREKAR, M.; MASSOVER, W.H.; YANG, G.; MATSUI, Y.; SADOSHIMA, J.; VATNER, S.F. Autophagy in chronically ischemic myocardium. **PNAS.**, v. 102, p 13807-13812, 2005.

YIMLAMAI, T.; DODD, S.L.; BORST, S.E.; PARK, S. Clenbuterol induces muscle-specific attenuation through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. **J. Appl. Physiol.**, n.99, p. 71-80, 2005.

YOUNG, J.B. Dissociation of sympathetic nervous system and adrenal medullary responses. **Am. J. Physiol.**, v. 247, p. E35-E40, 1984.

YOUNG, J.B.; LANDSBERG, L. The sympathoadrenal system and exercise: potential metabolic role in the trained and untrained states. In: Borer, K.T.; Edington, D.W.; White, T.P., eds. **Frontiers of Exercise Biology**. Champaign, IL: Human Kinectics Publishers. p. 152-172, 1983.

YOUNG, J.B.; LANDSBERG, L. Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in pancreas and liver. **Am. J. Physiol.**, v. 236, p. E524-E533, 1979.

YOUNG, J.B.; LANDSBERG, L. Supression of sympathetic nervous system during fasting. **Science.**, v. 196, p. 1473-1475, 1977.

ZHAO, J.; BRAULT, J.J.; SCHILD, A.; CAO, A.; SANDRI, M.; SCHIAFFINO, S.; LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteassomal pathways in atrophying muscle cells. **Cell. Metabolism**, v. 6, p. 472-483, 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](#)