

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

WILIAN DE ASSIS SILVEIRA

**EFEITO DA DESNERVAÇÃO SIMPÁTICA LOMBAR NA
DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS EM MÚSCULOS
ESQUELÉTICOS RATOS**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Ribeirão Preto
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

WILIAN DE ASSIS SILVEIRA

**Efeito da desnervação simpática lombar na
degradação de proteínas em músculos
esqueléticos de ratos**

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

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho
Navegantes

Ribeirão Preto
2010

Resumo

SILVEIRA, W. A. Efeito da desnervação simpática lombar na degradação de proteínas em músculos esqueléticos de ratos. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Em estudos anteriores de nosso laboratório demonstrou-se que o Sistema Nervoso Simpático exerce um controle inibitório da proteólise em músculos esqueléticos de roedores, sendo essas ações mediadas principalmente por meio da adrenalina e ativação da via de sinalização do AMPc. No entanto, o papel fisiológico da inervação simpática direta na musculatura esquelética ainda é pouco conhecido. Assim, o objetivo principal do presente trabalho foi investigar o efeito da desnervação simpática lombar (remoção dos gânglios da cadeia paravertebral) na degradação de proteínas em músculos esqueléticos ricos em fibras do tipo II (*extensor digitorum longus*, EDL) e músculos esqueléticos ricos em fibras do tipo I (*soleus*) de ratos, após 3, 7 e 15 dias.

A desnervação simpática foi eficiente em reduzir (85%) o conteúdo de noradrenalina em músculos *soleus* e EDL, sem alterar o conteúdo de proteínas, o tipo ou a área seccional transversa das fibras em ambos os músculos. Em EDL, a desnervação por 3 dias aumentou a atividade da adenilil ciclase (~111%) e o conteúdo de AMPc intracelular (~192%), mas não alterou o conteúdo da proteína G. Esses efeitos foram associados com uma menor degradação protéica (10%) e expressão gênica da MuRF-1 (~75%), uma E3-ligase, e LC3 (~65%), uma proteína marcadora de autofagia. Após 7 dias, a desnervação reduziu a proteólise total (21%) e a expressão gênica das E3-ligasas (atrogina-1 e MuRF-1) (~70%) e da LC3 (~65%). Além disso, a desnervação aboliu a hiperativação do sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma em animais jejuados por 48h. Embora a desnervação não tenha alterado o conteúdo de glicogênio, a velocidade de incorporação de [¹⁴C]-glicose em glicogênio (~70%)

e a oxidação de glicose estimulada pela insulina (~70%) foram aumentadas em músculos EDL desnervados por 3 dias.

Em *soleus*, a redução nas concentrações de noradrenalina por 3 dias resultou no aumento (~145%) da atividade máxima do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} avaliada *in vitro*. Em paralelo, o conteúdo da forma autolisada da μ -calpaína aumentou (~140%) significativamente nestes músculos, embora o conteúdo protéico da calpastatina, o inibidor endógeno das calpaínas, não tenha sido alterado.

Esses resultados indicam que a desnervação simpática lombar exerce efeitos distintos de acordo com o tipo de músculo estudado. Em músculos tipicamente glicolíticos como o EDL, a depleção aguda de noradrenalina muscular causa hipersensibilidade adrenérgica, sendo muito provavelmente o aumento do AMPc intracelular o mecanismo responsável pela redução da atividade e expressão de componentes do sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma e da autofagia. Em músculos oxidativos como o *soleus*, a falta da ação simpática local parece ser a principal responsável pelo aumento da atividade máxima do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} e do aumento conteúdo da μ -calpaína.

Palavras-chaves: Sistema nervoso simpático. Desnervação simpática lombar. Músculo esquelético. Sistemas proteolíticos. AMPc.

Abstract

SILVEIRA, W. A. Effects of lumbar sympathetic denervation on skeletal muscle protein degradation in rats. 2010. 80 p. Dissertation (Master degree) School of Medicine of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

In previous studies from our laboratory it was demonstrated that the Sympathetic Nervous System exerts an inhibitory control on proteolysis in skeletal muscles from rodents, being this effect mediated by epinephrine via cAMP cascade. However, the physiological role of the noradrenergic innervation in the skeletal muscle metabolism is still poorly understood. Thus, the main goal of the present work was to investigate the effects of lumbar sympathetic denervation on muscle protein breakdown in slow-twitch soleus and fast-twitch *Extensor digitorum longus* (EDL) muscles of young rats.

The sympathetic denervation significantly reduced the norepinephrine content (85%), without changing the protein content, the type, or the fiber cross-sectional area in both soleus and EDL muscles. In EDL, the 3-d-denervation increased the adenylyl cyclase activity (~111%) and the intracellular AMPc content, but it did not change the G-protein content. These effects were associated with a lower protein degradation (10%) and gene expression of MuRF-1 (~75%), an E3-ligase, and LC3 (~65%), a marker of autophagy. After 7 days, the denervation reduced the overall proteolysis (21%) and the gene expression of E3-ligases (atrogin-1 and MuRF-1) (~70%) and LC3 (~65%). Furthermore, the denervation abolished the hyperactivation of the Ub-proteasome-dependent proteolytic system in 48-h-fasted animals. Although the denervation did not change the glycogen content, the incorporation rate of [¹⁴C]glucose into glycogen and the glucose oxidation rate stimulated by insulin (~70%) were increased by 3-d-denervation in EDL muscles.

In soleus, the reduction of norepinephrine concentrations for 3 days resulted in an

increase (~145%) in the maximal activity of the Ca^{+2} -dependent proteolytic system evaluated in vitro. At the same time, the content of autolyzed μ -calpain form significantly increased (~140%) in these muscles, although the protein content of calpastatin, its endogenous inhibitor, has not been altered.

These data indicate that the lumbar sympathetic denervation exerts differential effects according to the type of muscle. In glycolytic muscles, such as EDL, acute depletion of muscular norepinephrine induces adrenergic hypersensitivity, being the muscle cAMP increase the probable mechanism involved in the reduction of activity and gene expression of Ub-proteasome-dependent proteolytic system and autophagy. In oxidative muscles, such as *soleus*, the lack of local sympathetic action seems to be the main responsible for the increase in the maximal activity of the Ca^{+2} –dependent proteolytic system and for the increase of μ -calpain content.

Keywords: Sympathetic system nervous. Lumbar sympathetic denervation. Skeletal muscle. Proteolytic systems. cAMP.

Lista de Siglas

AC	Adenilil ciclase
Akt	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
Atg	Genes relacionados à autofagia
ATP	Adenosina trifosfato
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada
CLP	Ligadura e punção do ceco
DB-AMPc	Dibutiril-AMPc
DTT	Ditiotreitol
DUBs	Deubiquitinases
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
Epac	Exchange protein directly activated by cAMP
EPM	Erro padrão da média
Foxo	Forkhead Box class o
GABARAP	γ -aminobutyric acid receptor-associated protein
GDP	Guanosina difosfato
GPCR	Receptores acoplados à proteínas G
GTP	Guanosina trifosfato
IBMX	Isobutilmetilxantina

IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IL-1	Interleucina-1
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
MG132	N-carboxibenzoxi-Leu-Leu-Leucinal
MuRF	Muscle RING (Really Interisting New Gene) Finger - 1
NC	Nitrocelulose
PI3K	Fosfaditilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RS	Retículo sarcoplasmático
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNS	Sistema nervoso simpático
TCA	Ácido tricloroacético
Ub	Ubiquitina

Sumário

1 – Introdução.....	1
1.1. Sistemas proteolíticos intracelulares na musculatura esquelética.....	1
<i>1.1.1. Sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma.....</i>	<i>2</i>
<i>1.1.2. Sistema proteolítico dependente de Ca⁺².....</i>	<i>3</i>
<i>1.1.3. Sistema proteolítico lisossomal.....</i>	<i>5</i>
1.2. Sistema Nervoso Simpático.....	6
<i>1.2.1. Papel do sistema nervoso simpático no metabolismo de proteínas.....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.2. As fibras simpáticas na musculatura esquelética.....</i>	<i>12</i>
2 – Objetivos.....	13
3 – Material e Métodos.....	14
3.1. Animais.....	14
3.2. Modelos experimentais.....	14
<i>3.2.1. Desnervação simpática lombar.....</i>	<i>14</i>
<i>3.2.2. Grupos Experimentais.....</i>	<i>15</i>
3.2. Determinação do conteúdo de noradrenalina muscular.....	16
3.4. Procedimentos experimentais para o estudo da proteólise em músculos esqueléticos de ratos.....	16
<i>3.4.1. Avaliação da atividade proteolítica.....</i>	<i>17</i>
<i>3.4.2. Procedimentos experimentais para a avaliação dos sistemas proteolíticos..</i>	<i>18</i>
3.5. Determinação das concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) em músculo esquelético de ratos.....	23
3.6. Quantificação do conteúdo dos diferentes componentes dos processos de degradação de proteínas em músculo esquelético de ratos.....	24

3.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).....	24
3.6.2. Western blot.....	25
3.7. Determinação da taxa de oxidação de glicose em músculos esqueléticos de ratos...	26
3.8. Determinação do conteúdo e da velocidade de síntese do glicogênio muscular.....	27
3.9. Determinação da atividade da Adenilil Ciclase.....	27
3.9.1. Preparação de membrana de músculos esqueléticos.....	27
3.9.2. Atividade da adenilil ciclase.....	28
3.9.3. Quantificação do AMPc produzido.....	28
3.10. Ativação da proteína G.....	29
3.10.1. Preparação de membranas para os ensaios de ligação do [³⁵ S] GTPγS.....	29
3.10.2. Ensaio de ligação do [³⁵ S] GTPγS em preparação de membranas.....	29
3.11. Análise estatística.....	30
4 – Resultados.....	31
4.1. Efeito da desnervação simpática lombar nas concentrações de noradrenalina muscular.....	31
4.2. Massa muscular, tipagem, área seccional transversa e densidade capilar das fibras musculares esqueléticas.....	33
4.3. Proteólise total e atividades dos sistemas proteolíticos em músculos esqueléticos de ratos alimentados e jejuados.....	36
4.3.1. Proteólise total.....	37
4.3.2. Atividade proteolítica do sistema dependente de Ub-proteassoma e expressão das Ub-ligases.....	39
4.3.3. Atividade proteolítica do sistema dependente de Ca ⁺² e conteúdo das calpaínas e calpastatina.....	42

4.3.4. Atividade do sistema lisossomal e expressão da LC3.....	47
4.4 - Atividade e conteúdo de componentes da via de sinalização β -adrenérgica em músculos esqueléticos de ratos.....	48
4.5 - Alterações do metabolismo de carboidratos.....	51
5 – Discussão.....	53
<i>Efeito da desnervação simpática lombar na proteólise de músculos EDL de ratos alimentados e jejuados.....</i>	<i>54</i>
<i>Efeito da desnervação simpática lombar no metabolismo de proteínas em músculos soleus de ratos.....</i>	<i>63</i>
<i>Efeito da desnervação simpática lombar no metabolismo de glicose em músculos esqueléticos de ratos.....</i>	<i>65</i>
6 – Conclusões.....	68
7 – Referências Bibliográficas.....	70

1 – Introdução

O músculo esquelético é o tecido mais abundante no corpo humano contribuindo com cerca de 40% da massa corporal total de um indivíduo adulto. Devido a sua grande representatividade, este tecido exerce funções de fundamental importância. Dentre estas, é responsável pela geração de força para locomoção, respiração e sustentação postural, além de aumentar a produção de calor e fornecer aminoácidos para diversos processos metabólicos como, por exemplo, a gliconeogênese hepática (POWERS & HOWLEY, 2005; KETTELHUT et al., 1988).

A manutenção da massa muscular esquelética é resultante do balanço entre dois processos distintos e precisamente regulados: a síntese e a degradação protéica. Estes dois processos, responsáveis pela renovação de proteínas intracelulares e pela determinação final da massa muscular esquelética, são modulados por fatores neurais, hormonais, nutricionais e mecânicos (NAVEGANTES et al., 2002; LIU et al., 2006; NAKASHIMA et al., 2005; KADOWAKI & KANAZAWA, 2003; SPANGENBURG, 2009). Embora a via de síntese de proteínas esteja relativamente bem estudada, o processo de degradação e os mecanismos moleculares envolvidos no controle dos sistemas proteolíticos intracelulares ainda são pouco compreendidos.

1.1 Sistemas proteolíticos intracelulares na musculatura esquelética

Hoje, sabe-se que além do *sistema proteolítico lisossomal* existem pelo menos dois outros sistemas de degradação envolvidos no processo de renovação de proteínas intracelulares no músculo esquelético: o *sistema proteolítico dependente de cálcio* (Ca^{+2}) e o *sistema proteolítico dependente de ubiquitina (Ub)-proteassoma* (GOLL et al., 2008).

1.1.1. Sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma

O sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma é responsável pela degradação

de aproximadamente 80% das proteínas miofibrilares e, sem dúvida, é o que assume maior importância no controle da proteólise muscular. A degradação de proteínas intracelulares realizadas pelo sistema Ub-proteassoma consiste em dois passos distintos: o primeiro envolve a marcação do substrato protéico por meio de uma ligação covalente a uma cadeia de moléculas de ubiquinina e o segundo resulta na degradação da proteína marcada pelo complexo 26S do proteassoma. Após o reconhecimento da proteína alvo pelo proteassoma, a ubiquitina é liberada do substrato pelas enzimas de reciclagem chamadas de deubiquitinasas (DUBs) para que possa ser posteriormente reutilizada.

A conjugação da ubiquitina aos seus substratos protéicos envolve uma cascata de três etapas sucessivas de reações enzimáticas: Inicialmente, a ubiquitina é ativada pela enzima E1 (proteína ativadora de ubiquitina), em uma reação dependente de ATP; a etapa seguinte é catalisada pela enzima E2 (enzima carreadora ou enzima conjugadora de ubiquitina), a qual transfere a ubiquitina ativada e ligada a E1 ao substrato que fora especificamente selecionado e ligado a um dos membros da família de proteínas ligases de ubiquitina, as chamadas E3-ligases (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002). Embora existam várias E3-ligases, duas dessas proteínas, especificamente expressas na musculatura esquelética e cardíaca, apresentam suas expressões extremamente aumentadas frente a diversos modelos de atrofia muscular. Gomes et al. (2001) demonstraram que uma proteína com domínio F-box pertencente à família das E3-ligases e denominada de *atrogina-1* ou MAFbx (*Muscle Atrophy F-box*) tinha seus níveis de RNAm elevados em até nove vezes em músculos esqueléticos de animais submetidos ao jejum, *diabetes*, câncer e insuficiência renal, quando comparados aos animais controles. Dados bastante semelhantes foram obtidos simultaneamente pelo grupo de Bodine et al. (2001). Esses autores demonstraram que os genes dessas mesmas proteínas também apresentaram uma *up-regulation* em diferentes modelos atróficos, tais como a desnervação motora, imobilização e desuso, além daqueles observados nos modelos atróficos

induzidos pelo tratamento com IL-1 e dexametasona. A partir dos dados apresentados nestes estudos, sugeriu-se a existência de um grupo de genes que eram responsáveis pela ativação de um “programa atrófico” em diferentes tipos de atrofia muscular (GOMES et al., 2001).

Após o processo de ubiquitinação, o substrato protéico poderá ser reconhecido pelo proteassoma 26S, liberando-se assim pequenos peptídeos e aminoácidos no citosol como resultado da degradação. O proteassoma 26S é formado por dois subcomplexos: o 19S e o 20S. O subcomplexo regulatório 19S do proteassoma é composto por pelo menos 17 subunidades diferentes, sendo algumas destas responsáveis pelo reconhecimento e ligação das proteínas alvo, pela remoção da cauda poliubiquitinada e pelo desenovelamento das mesmas, as quais são direcionadas ao subcomplexo 20S. Esta subunidade, por sua vez, é um cilindro formado por dois anéis de sete subunidades α (um anel acima e outro abaixo das subunidades β) e quatro anéis centrais de sete subunidades β , onde se encontra o centro catalítico do proteassoma 26S (WOLF & HILT, 2004).

1.1.2. *Sistema proteolítico dependente de Ca^{+2}*

O sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} , como o próprio nome já o apresenta, é um sistema de degradação de proteínas intracelulares que é ativado por íons Ca^{+2} . Este sistema foi descoberto por Guroff (1964) na fração solúvel de neurônios de ratos e, posteriormente, as suas proteases foram também purificadas em diversos outros tecidos, inclusive no músculo esquelético (DAYTON et al., 1981) e cardíaco (MELLGREN, 1980).

Esse sistema de degradação é composto por cisteína-proteases denominadas de calpaínas e é o único, até então descrito, que apresenta um inibidor endógeno de suas proteases: a calpastatina, uma proteína que já foi isolada em diversos tecidos, incluindo a musculatura esquelética (NAKAMURA et al., 1984). Existem três isoformas de calpaínas conhecidas: calpaína 1, 2 e 3, sendo a última, específica da musculatura esquelética, também

denominada de p94 (KINBARA et al., 1998). As duas primeiras, calpaínas 1 e 2, são também denominadas de micro-calpaína (μ -calpaína) e mili-calpaína (m-calpaína) pois apresentam metade de suas atividades máximas em concentrações de Ca^{+2} compreendidas entre 5-50 μM e 200-1000 μM , respectivamente (INOMATA et al., 1983). As duas isoformas são heterodímeros semelhantes com peso molecular de 110 kDa e constituídos por uma subunidade de 80 kDa, responsável pela atividade proteolítica e ligação ao Ca^{+2} , e outra de 30 kDa que parece estar relacionada com associação da enzima à membrana plasmática, assim como com a modulação da atividade catalítica desta enzima (MELLONI, et al. 1992).

Esse sistema de degradação de proteínas parece estar ativado em diversos modelos de atrofia onde se observam que a perda da massa muscular normalmente está associada com o aumento nos níveis intracelulares de Ca^{+2} , tais como na sepse (WEI et al., 2005), desuso por perda gravitacional (SHENKMAN & NEMIROVSKAYA, 2008) e nas distrofias musculares (TIDBALL & SPENCER, 2000). Sugere-se que para que haja atrofia, deva existir inicialmente uma interação funcional entre os sistemas proteolíticos dependente de Ca^{+2} e dependente de Ub-proteassoma (JACKMAN & KANDARIAN, 2004). De fato, o proteassoma não é capaz de degradar diretamente as proteínas miofibrilares dispostas na estrutura do sarcômero. Acredita-se que as calpaínas primeiramente degradem proteínas estruturais sarcoméricas tais como a desmina, titina e nebulina, liberando os filamentos grossos de actina e miosina para que estes possam ser degradados pelo proteassoma, uma vez que as calpaínas não são capazes de exercer tal função (GOLL et al., 2008). Portanto, as calpaínas parecem ser as principais responsáveis pelo início do processo de renovação das proteínas miofibrilares.

1.1.3. Sistema proteolítico lisossomal

O último sistema proteolítico intracelular aqui apresentado é o mais bem conhecido,

pois foi também o primeiro a ser descrito. A organela responsável pela degradação de proteínas deste sistema é o lisossomo que normalmente possui um lúmen ácido (pH 4-5). No interior desta organela, estão contidas as proteases responsáveis pela capacidade proteolítica do sistema lisossomal, conhecidas como catepsinas (B, D, H, e L), além de altas concentrações de hidrolases ácidas. Essas enzimas são responsáveis por degradar grande parte das proteínas extracelulares e de membrana endocitadas, bem como proteínas citoplasmáticas e até mesmo organelas (TANIDA et al., 2004). Diferentes vias podem ser utilizadas na oferta de substratos protéicos intracelulares para o lisossomo: microautofagia, autofagia mediada por chaperona e macroautofagia (BECHET et al., 2005). Dentre essas, a macroautofagia (também denominada como autofagia) parece ser a mais importante na musculatura esquelética.

A importância do processo autofágico em situações normais e atroficas tem recentemente sido demonstrada. Curiosamente, ao contrário do que se achava, a inibição da autofagia em animais transgênicos não previne a atrofia, mas sim leva a um conjunto de alterações estruturais, em diferentes níveis celulares, que contribuem para a perda exacerbada de massa muscular esquelética associada ao jejum e à desnervação atrofica (MASIERO et al., 2009). Dessa forma, a deleção de um gene autofágico crucial para a formação do autofagossomo denominado de *Atg7* leva ao acúmulo de mitocôndrias anormais, distensão do retículo sarcoplasmático e formação de estruturas membranosas concêntricas aberrantes (MASIERO et al., 2009). Estes resultados indicam que o processo autofágico desempenha funções essenciais para a viabilidade da fibra muscular em situações normais. Por outro lado, há evidências que a expressão de genes autofágicos está diretamente associada à atrofia em células musculares (ZHAO, et al., 2007). Assim, dois genes autofágicos, LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*) e GABARAP (*γ-aminobutyric acid receptor-associated protein*), os quais possuem papel fisiológico importante no processo de formação do autofagossomo, têm sido utilizados como marcadores de autofagia em diversos tecidos,

inclusive na musculatura esquelética de animais submetidos a situações que levam à perda de massa muscular (TANIDA et al., 2005; OGATA, et al., 2010).

1.2. Sistema Nervoso Simpático

O sistema nervoso simpático (SNS) atua por meio de duas principais moléculas sinalizadoras: a adrenalina que é secretada diretamente na circulação sanguínea pelas células cromafins, presentes na medula da glândula adrenal, e a noradrenalina também secretada na medula da adrenal, sendo, entretanto, o principal neurotransmissor sintetizado e liberado na fenda sináptica pelas terminações das fibras pós-ganglionares simpáticas que inervam diversos tecidos periféricos incluindo o muscular esquelético.

Estudos anteriores demonstraram que a fibra muscular esquelética possui no sarcolema uma grande quantidade de receptores β -adrenérgicos, cuja expressão varia de acordo com o tipo de músculo. Assim, em músculos *soleus*, de metabolismo predominantemente oxidativo e composto principalmente por fibras do tipo I, existe aproximadamente três vezes mais receptores β -adrenérgicos quando comparados a músculos *vastus lateralis* ou *extensor digitorum longus* (EDL), de metabolismo predominantemente glicolítico e composto principalmente por fibras do tipo II (MARTIN et al., 1989). Embora ainda não se compreenda a importância funcional destas diferenças, sabe-se que cerca de 80% desses receptores, em músculos vermelhos e brancos, é composto pelo receptor adrenérgico do subtipo β_2 (KIM et al., 1991). Vários autores têm demonstrado também a presença de receptores β_3 -adrenérgicos e de seu RNA mensageiro (RNAm) em músculos ricos em fibras do tipo I, como o músculo *soleus* de rato (KIM et al., 1991; EVANS et al., 1996). Uma pequena quantidade de receptores β_1 -adrenérgicos (7-10%) também está presente nos dois tipos de músculos (JENSEN et al., 1994). Ao contrário dos receptores β -adrenérgicos, os receptores α -adrenérgicos são muito pouco distribuídos na membrana plasmática das fibras musculares

esqueléticas de ratos, estando em sua maioria presente na musculatura lisa das arteríolas musculares (MARSHALL, 1982). Enquanto os receptores α -adrenérgicos do subtipo α_1 parecem estar envolvidos com o controle da vasoconstrição de arteríolas de grande resistência, a função dos receptores α -adrenérgicos do subtipo α_2 está associada ao controle do fluxo de pequenas arteríolas pré-capilares (FABER, 1988).

As ações metabólicas do SNS na maioria dos tecidos periféricos ocorrem por meio da ativação de receptores β_2 -adrenérgicos acoplados à proteínas G. Em seguida, ocorre estimulação da enzima adenilil ciclase (AC) que resulta no aumento do conteúdo intracelular do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e subsequente ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Classicamente, os efeitos do SNS mediados pela via da PKA estão associados a eventos catabólicos no metabolismo de carboidratos e lipídeos, como a ativação da glicogenólise e lipólise (LANDSBERG & YOUNG, 1992). Entretanto, as suas ações no controle do metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos parecem ser anabólicas (NAVEGANTES et al., 2002).

Além das ações metabólicas exercidas na musculatura esquelética, as catecolaminas parecem também modular a função motora deste tecido. Dessa forma, trabalhos têm demonstrado que a adrenalina e seu segundo mensageiro AMPc são capazes de potencializar a força de contração em músculos esqueléticos (WILLIAMS & BARNES, 1989). A modulação da contratilidade muscular pelas catecolaminas e agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos parece ocorrer principalmente pela ação destas moléculas nos receptores de rianodina do retículo sarcoplasmáticos (RS), envolvidos com o efluxo de cálcio, e na proteína inibitória das bombas de Ca^{+2} , o fosfolambam, para aumentar a velocidade de re-captção do Ca^{+2} no RS (HA et al., 1999; ROATTA & FARINA, 2010). Ambos os tipos de fibras musculares exibem os efeitos inotrópicos (contratilidade) das catecolaminas, enquanto que os efeitos lusitrópicos (relaxamento) parecem ocorrer apenas em músculos oxidativos, tais como o *soleus* e o coração,

uma vez que os músculos glicolíticos, composto principalmente por fibras do tipo II, não possuem a proteína fosfolambam do RS (ROATTA & FARINA, 2010). Essas evidências sugerem um controle adrenérgico diferencial no transiente de Ca^{+2} intracelular em músculos oxidativos e glicolíticos.

1.2.1. Papel do sistema nervoso simpático no metabolismo de proteínas

Nos últimos 15 anos, o nosso laboratório tem se dedicado a investigar o papel do SNS no controle do metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos. A adoção desta linha de pesquisa foi motivada por estudos na década de 80 demonstrando a presença de terminações noradrenérgicas inervando diretamente fibras musculares esqueléticas de gatos (BARKER & SAITO, 1981) e ratos (BARON et al., 1988), e da constatação de que a administração de agonistas β_2 -adrenérgicos era capaz de aumentar a massa muscular esquelética em animais de interesse agropecuário (KIM & SAINZ, 1991; MERSMANN, 1998).

Em estudos iniciais, demonstrou-se que o bloqueio adrenérgico induzido pelo tratamento com guanetidina (um inibidor pré-sináptico das terminações simpáticas), durante 4 dias, causou uma redução da velocidade de síntese protéica em músculos *soleus* de ratos, sendo este efeito revertido pela incubação *in vitro* com isoproterenol, um agonista β -adrenérgico. Investigando os efeitos da simpatectomia química na proteólise muscular, verificou-se um aumento agudo na atividade do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} em músculos *soleus* de ratos (NAVEGANTES et al., 1999). Vale à pena ressaltar que este aumento da proteólise era extremamente fugaz, sendo apenas observado durante os dois primeiros dias de simpatectomia e rapidamente revertido para valores abaixo dos controles ao longo do tempo. Com o objetivo de investigar o papel fisiológico da adrenalina no controle da proteólise muscular, em situações basais, utilizou-se um segundo modelo de desnervação

conhecido como adrenodemedulação, o qual consiste na remoção cirúrgica da porção medular da adrenal. Isto resulta em uma redução de 95% das concentrações plasmáticas de adrenalina, sem que haja alteração do conteúdo de noradrenalina muscular. De forma bastante similar ao que acontecia com o modelo da simpatectomia química, observou-se que a adrenodemedulação induziu um aumento agudo na degradação de proteínas dependente de Ca^{+2} , sendo este efeito novamente revertido logo após 4 dias da adrenodemedulação. Em estudos paralelos, demonstrou-se que a atividade proteolítica dependente de Ca^{+2} em músculos de ratos normais era reduzida *in vitro* na presença de adrenalina (NAVEGANTES et al., 2000). Em experimentos posteriores verificou-se que os efeitos inibitórios exercidos pela adrenalina eram mediados pela ativação de receptores β_2 -adrenérgicos, uma vez que a proteólise total diminuiu cerca de 35% na presença de 10^{-5} M de clenbuterol (agonista β_2 -adrenérgico seletivo) ou adrenalina, sendo este efeito prevenido pelo ICI-118,551, um antagonista seletivo de receptores β_2 -adrenérgicos (NAVEGANTES et al., 2001). Em seguida, demonstrou-se que, além dos receptores β_2 -adrenérgicos, receptores β_3 -adrenérgicos também participavam da ação antiproteolítica exercida pela adrenalina em músculos *soleus* de ratos por meio da inibição da atividade máxima do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} *in vitro* (NAVEGANTES et al., 2006). Curiosamente, os efeitos antiproteolíticos mediados pelos β_3 -adrenoceptores não foram observados em músculos EDL. A partir deste conjunto de dados, propôs-se que a adrenalina circulante exerce um controle inibitório tônico da atividade proteolítica dependente de Ca^{+2} na musculatura oxidativa (*soleus*), sendo este efeito diretamente mediado pela ativação de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos (NAVEGANTES et al., 2002). Este efeito adrenérgico poderia ser decorrente de uma inibição da atividade das calpaínas e/ou de um aumento da atividade de seu inibidor endógeno, a calpastatina. No entanto, ainda permanecem desconhecidos os mecanismos moleculares envolvidos com esta resposta.

Nesses estudos iniciais observou-se também existir uma clara diferença entre os efeitos da desnervação química induzida por guanetidina nos processos de degradação de proteínas em músculos oxidativos (*soleus*) e glicolíticos (EDL), sugerindo um controle adrenérgico diferencial entre estes músculos. Curiosamente, ao contrário do *soleus*, a atividade proteolítica em músculos EDL de ratos foi extremamente reduzida pela guanetidina logo após o primeiro dia do tratamento e permaneceu assim até o quarto dia de simpatectomia (NAVEGANTES et al., 1999). Na tentativa de explicar estes resultados formularam-se duas hipóteses. A primeira delas era que estaria havendo um aumento da sensibilidade adrenérgica nos músculos EDL desnervados. Tendo em vista que a incubação de músculos normais na presença de análogos do AMPc ou de inibidores da fosfodiesterase do AMPc resultava em efeitos antiproteolíticos, principalmente em músculos EDL (NAVEGANTES, et al., 2000), especulou-se que um possível aumento deste nucleotídeo cíclico no músculo, em resposta à simpatectomia química, poderia explicar a inibição da proteólise muscular. Além disso, por razões ainda completamente desconhecidas, músculos brancos parecem ser mais responsivos aos efeitos hipertróficos induzidos pelo tratamento com β_2 -agonistas (SHI et al., 2007). Outra possibilidade que foi aventada era que a desnervação química estivesse facilitando a ação antiproteolítica muscular da insulina. Esta hipótese foi baseada no fato de que sabidamente as catecolaminas antagonizam certas ações da insulina na musculatura esquelética. É bem conhecido que o tratamento com guanetidina em humanos aumenta a tolerância à glicose em pacientes diabéticos (KANSAL et al., 1971). Independentemente do que levava à redução da proteólise em músculos EDL desnervados e na reversão do efeito proteolítico observado em *soleus*, esses dados indicavam claramente a existência de mecanismos que eram acionados após a desnervação química no sentido de restringir o aumento na degradação protéica na musculatura esquelética.

Considerando que o modelo de simpatectomia química induzida pelo tratamento

com guanetidina resultou em redução das concentrações plasmática de adrenalina e depleção generalizada da noradrenalina em todos os tecidos periféricos, não foi possível saber qual a contribuição exata da inervação simpática muscular na regulação da proteólise. Portanto, tornou-se interessante investigar nesse trabalho as possíveis alterações dos diferentes sistemas proteolíticos em músculos de ratos submetidos a uma desnervação seletiva das fibras simpáticas que inervam diretamente este tecido.

1.2.2. *As fibras simpáticas na musculatura esquelética*

BOEKE foi primeiro a descrever a presença de “terminações simpáticas acessórias” próximas ou no interior da placa motora somática (apud BARKER & SAITO, 1981). Embora BALLARD (1978) também tenha observado a existência de terminações noradrenérgicas em associação com fibras musculares, foram os estudos de BARKER & SAITO (1981) que demonstraram, convincentemente, a presença da inervação noradrenérgica em fibras musculares intra e extra-fusais de gatos, independentemente da inervação de arteríolas e veias (figura 1A). Estudos posteriores, utilizando marcadores neurais retrógrados (“*horseradish*” peroxidase) tiveram como objetivo determinar a origem dessas fibras simpáticas e demonstraram que mais de 75% dos axônios simpáticos que compõem os nervos que suprem os músculos gastrocnêmios e *soleus* de ratos, assim como aqueles que compõem o nervo tibial, tinham seus corpos celulares localizados nos gânglios L2/L3 e L3/L4 da cadeia simpática paravertebral lombar, respectivamente (BARON et al., 1988). Além disso, foi demonstrada a existência de variações anatômicas no que diz respeito à organização da cadeia simpática paravertebral lombar de ratos. Miao et al. (1995) observaram que, embora existam pelo menos dois gânglios responsáveis pela inervação do lado direito e esquerdo do corpo do animal, no

segmento lombar da maioria dos ratos estudados (>75%) os dois gânglios simpáticos L3 apresentavam-se fundidos, representando uma única estrutura (figura 1B).

Com a descrição da localização anatômica dos gânglios L2/L3 da cadeia simpática paravertebral lombar, onde estão contidos os corpos celulares das fibras simpáticas que inervam diretamente os músculos esqueléticos da pata posterior de ratos (BARON et al., 1988), tornou-se possível a investigação do papel fisiológico desta inervação no metabolismo de proteínas em músculos *soleus* e EDL de ratos, por meio da observação nas alterações ocorridas após a remoção cirúrgica do segmento lombar compreendido entre L2 e L3.

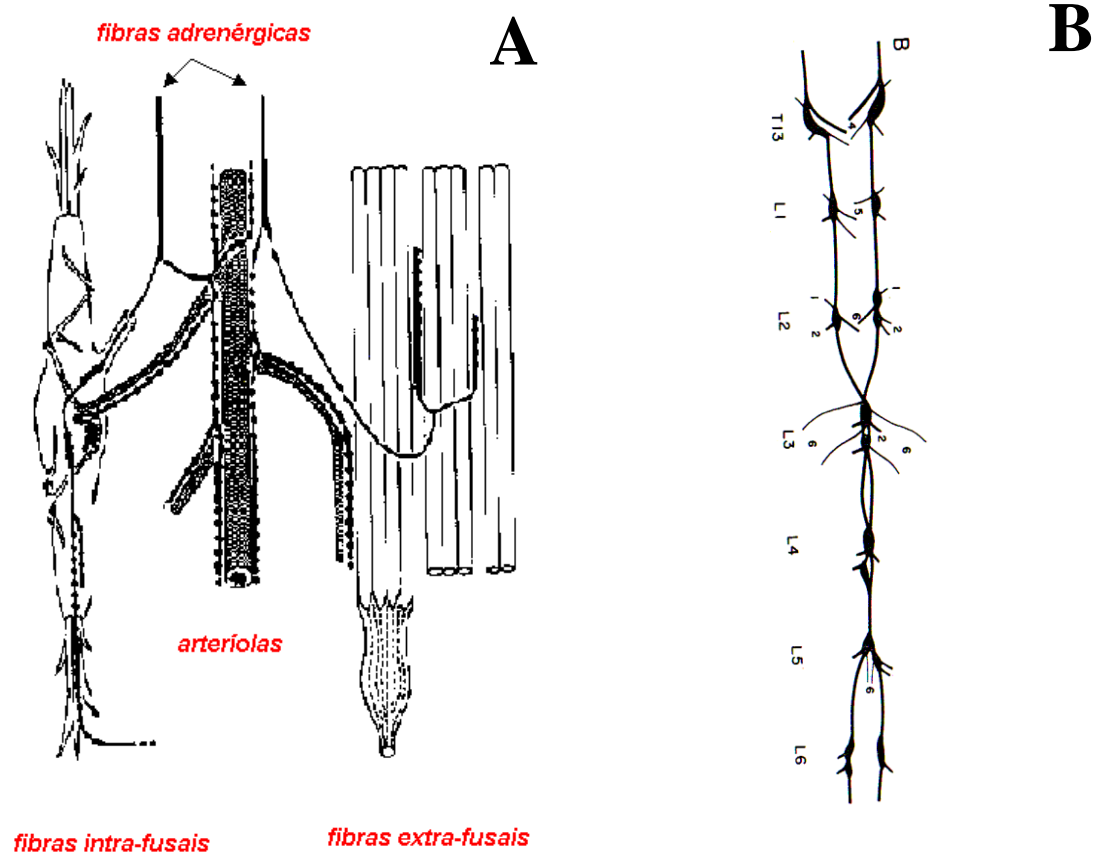


Figura 1. (A) Representação esquemática da inervação noradrenérgica de fibras intra e extra-fusais na musculatura esquelética de gatos (Modificado de BARKER & SAITO, 1981); (B) Desenho representativo da organização anatômica da cadeia simpática paravertebral lombar de ratos (Modificado de MIAO et al., 1995).

2 – Objetivos

O *objetivo principal* do presente estudo foi investigar o papel fisiológico da inervação simpática direta do músculo esquelético no controle da proteólise intracelular. Utilizando músculos esqueléticos oxidativos (*soleus*) e glicolíticos (EDL) de ratos submetidos à desnervação simpática lombar (após 3, 7 ou 15 dias), este trabalho teve como objetivos específicos:

1. *Quantificar o conteúdo de noradrenalina em diferentes músculos esqueléticos;*
2. *Avaliar as possíveis alterações na massa muscular, assim como no tipo, área e densidade capilar das fibras musculares esquelética;*
3. *Quantificar a proteólise total e as atividades dos sistemas proteolíticos dependente de Ca^{+2} , Ub-proteassoma e lisossomal;*
4. *Avaliar a expressão gênica das Ub-ligases (atrogina-1 e MuRF-1) e de LC3, um marcador do processo autofágico;*
5. *Determinar o conteúdo protéico da μ -calpaína (em suas formas autolisada, não autolisada e total) e de seu inibidor endógeno, a calpastatina;*
6. *Quantificar o conteúdo de AMPc, atividade da adenilil ciclase, conteúdo e atividade (basal e estimulada pelo isoproterenol) da proteína G;*
7. *Verificar parâmetros relacionados ao metabolismo de carboidratos como o conteúdo de glicogênio, a velocidade do fluxo de glicose na via de síntese de glicogênio e a oxidação de glicose.*

3 - Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com massa corporal entre 55-60g e 180-200g (apenas para dosagem de noradrenalina muscular) 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 as 6:00 horas e apagadas as 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 017/2009). Os experimentos foram realizados pela manhã, sendo iniciados entre 8:00 e 9:00 horas sendo o sacrifício dos animais realizado por deslocamento cervical.

3.2. Modelos experimentais

3.2.1. *Desnervação simpática lombar*

A simpatectomia cirúrgica, modelo da desnervação simpática lombar utilizado neste trabalho, consiste na remoção cirúrgica do segmento lombar compreendido entre os gânglios L2 e L3 da cadeia paravertebral simpática responsáveis por aproximadamente 75% da inervação simpática direta dos músculos da pata posterior de ratos (baseado nos trabalhos de BARON et al., 1988). Os animais foram anestesiados com ketamina (0,1 ml/100g de peso corporal) associada a um relaxante muscular (xilazina – 0,07 ml/100g de peso corporal) e submetidos à tricotomia da superfície ventral da parede abdominal. Em seguida, foi feita uma

incisão longitudinal ampla ao longo da linha média, de aproximadamente 4 cm, até as proximidades do esterno. As alças intestinais foram exteriorizadas e rebatidas para o lado direito, permanecendo cobertas por gaze umedecida com soro fisiológico. O tecido conjuntivo abaixo da inserção da artéria renal esquerda na aorta foi dissecado até a visualização e remoção dos dois gânglios lombares correspondentes ao segmento L2 direito e esquerdo da cadeia paravertebral simpática. Da mesma forma, tomando-se como referência a artéria íleo-lombar esquerda, o gânglio L3 foi identificado e removido. Ao final destes procedimentos as alças intestinais foram repostas na cavidade abdominal e então realizada a sutura do peritônio e da pele com pontos contínuos e a esterilização da ferida cirúrgica com álcool iodado.

3.2.2. Grupos Experimentais

Para a maioria dos experimentos foram utilizados basicamente quatro grupos de animais:

- a) Grupo sham (alimentado): esse grupo de animais sofreu exatamente os mesmos procedimentos cirúrgicos que receberam os animais desnervados, mas a inervação simpática muscular foi mantida intacta.
- b) Grupo Desnervado (Alimentado): nesse grupo experimental os animais foram submetidos à remoção cirúrgica dos gânglios L2 e L3 da cadeia paravertebral simpática lombar.
- c) Grupo sham (jejuado): esse grupo de animais sofreu exatamente os mesmos procedimentos cirúrgicos que receberam os animais desnervados, mas a inervação simpática muscular foi mantida intacta. No quinto dia após o procedimento cirúrgico esses animais foram submetidos ao jejum de 48 horas sendo os seus músculos *soleus* e EDL avaliados 7 dias após a cirurgia.
- d) Grupo Desnervado (jejuado): nesse grupo experimental os animais foram

submetidos à remoção cirúrgica dos gânglios L2 e L3 da cadeia paravertebral simpática lombar. No quinto dia após a desnervação esses animais foram submetidos ao jejum de 48 horas sendo os seus músculos *soleus* e EDL avaliados 7 dias após a cirurgia.

3.3. Determinação do conteúdo de noradrenalina muscular

A comprovação da eficiência do modelo de simpatectomia cirúrgica utilizado neste trabalho foi realizada através da determinação das concentrações de noradrenalina nos músculos *soleus* e EDL. Essa medida é feita através de método previamente padronizado em nosso laboratório (GARÓFALO et al., 1996). As amostras foram analisadas em um cromatógrafo equipado com uma coluna de fase reversa, acoplado a um detector eletroquímico e a um polígrafo.

3.4. Procedimentos experimentais 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 *soleus* e EDL. Em seguida, os músculos foram pesados em balança eletrônica digital (ACATEC 100), incubados com seus tendões fixados a suportes apropriados em 2 mL de 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 alumínio para o *soleus* e de

acrílico para o EDL, 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, fosfocreatina e glicogênio, reproduzindo-se *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, 1988; 1994).

3.4.1. 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 e 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 foram incubados em 2 mL de meios adequados, aerados com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂), permanecendo por 1 hora em banho sob agitação constante à 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, dada a continuidade da 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.

3.4.2. Procedimentos experimentais para a avaliação dos sistemas proteolíticos

Os sistemas proteolíticos estudados em músculos *soleus* e EDL foram: o sistema lisossomal, o sistema dependente de Ca^{+2} e o sistema dependente de ubiquitina-proteassoma, 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 a neutralidade (pH 5,9-6,2), inibindo-se 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 *soleus* e EDL 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		
COMPONENTES DO MEIO	MÚSCULOS	
	<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 ^{14}C -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 Ca^{2+}

Dois protocolos distintos foram utilizados para o estudo do sistema dependente de Ca^{2+} : O primeiro protocolo 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 o E64 e 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).

No segundo protocolo, um dos músculos é incubado livre, na ausência de suporte, em meio Krebs contendo Ca^{2+} . Nesta situação ocorre um encurtamento do seu comprimento de repouso, dificultando assim a passagem de nutrientes e oxigênio, e conduzindo a perda da integridade da membrana plasmática. Conseqüentemente, há um aumento da entrada de Ca^{2+} (FARBER et al., 1981) nas células resultando em ativação das calpaínas. Para a determinação da atividade desse sistema por esse protocolo comparam-se os valores da liberação de tirosina de músculos incubados com ou sem suporte e a diferença entre esses valores representa a participação do sistema dependente de Ca^{2+} , conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 2 - Protocolo 1 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*	+	+
E64 ¹ (25 μM) e leupeptina (50 μM)	-	+
Cálcio	-	+

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

¹trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano**Tabela 3** - Protocolo 2 utilizado para a quantificação da atividade máxima do sistema dependente de Ca^{2+} .

MÚSCULOS 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 + Ca^{2+})	+	+
Glicose (5 mM)	+	+
Cicloheximida (0,5 mM)	+	+
Metilamina (10 mM), insulina (0,1 U/ml) e BCAA*	+	+
Suporte mantendo o comprimento de repouso	-	+

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

C - Sistema dependente de Ub-proteassoma

Foram utilizados músculos incubados com seus tendões fixos a suportes em meio isento de Ca^{2+} , contendo E64, 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 ubiquitina-proteassoma foi realizada utilizando as condições de incubação descritas na tabela 4.

Tabela 4 - 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 μM) e leupeptina (50 μM)	+	+
MG132 (20 μM)	-	+

* 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 4).

3.5. Determinação das concentrações intracelulares de adenosina monofosfato ciclico (AMPc) em músculo esquelético de ratos

No dia do experimento, os músculos *soleus* e EDL foram imediatamente removidos após o deslocamento cervical, embalados em papel alumínio e congelados a -80°C . O processamento dos músculos para posterior realização dos testes foi feito da seguinte maneira: os músculos foram homogeneizados em TCA 6%, na proporção 5% massa/volume. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi recolhido, lavado 2 vezes com 4mL de éter dietílico para remoção de resíduos lipídicos. A fração aquosa foi separada e liofilizado para determinação dos níveis de AMPc. O extrato seco foi ressuspendido em 1 mL do tampão de ensaio do teste. Para a determinação do conteúdo de AMPc nas amostras foi utilizado um método imunoenzimático comercial da Amersham Biosciences (*cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay EIA system – RPN225*). Este método baseia-se em um princípio imunoenzimático competitivo, onde os poços da placa para o teste são tratados com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho; este anticorpo IgG de coelho reconhece especificamente o AMPc. O ensaio é baseado na competição entre o AMPc da amostra tecidual e uma quantidade fixa de AMPc marcado com peroxidase (oferecido pelo próprio kit). Dessa maneira, a quantidade de AMPc marcado ligado ao anticorpo anti-AMPc foi oposta a concentração de AMPc da amostra desconhecida. O complexo anti-IgG/anti-AMPc/AMPc-peroxidase pode ser quantificado após a adição do substrato para a peroxidase [3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB)] e peróxido de hidrogênio, ocorrendo a formação de produto colorido que pode ser quantificado em comprimento de onda de 450 nm (após a

adição de 1M de ácido sulfúrico, coloração amarela), em espectrofotômetro para microplaca (leitor de ELISA). A sensibilidade do método é na faixa de detecção de 12,5 a 3200 fmol de AMPc por poço. Os resultados foram expressos em fmol de AMPc/mg de músculo.

3.6. Quantificação do conteúdo dos diferentes componentes dos sistemas de degradação de proteínas em músculo esquelético de ratos

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

Os músculos esqueléticos *soleus* e EDL de ratos foram homogeneizados no Politrom, em 6 volumes de tampão A (50 mM de Tris pH 7,4, 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de Triton X- 100, 1% de deoxicolato de sódio, 1% SDS, 5 µg/ml de aprotinina e 1 µg/ml de leupeptina). O homogenado foi centrifugado a 15.000 rpm, 4°C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para quantificação de proteína pelo método de Lowry et al. (1951) e posteriormente para identificação do conteúdo das diferentes proteínas. Foi adicionado tampão [solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 4%, 125 mM de Tris-HCl, glicerol 20%, 100 mM de DTT, azul de bromofenol 2% e pH 6,8 ajustado com 1M de HCl] às amostras do sobrenadante.

A eletroforese em gel de SDS-PAGE foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). As amostras foram aquecidas a 100°C por 4 minutos e aplicadas em sistema de mini-gel vertical (modelo Protean III e IV Cell BioRad, Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) de acrilamida:bisacrilamida com 0,75 mm de espessura, gel de separação variando de 6 a 14%. Na lateral foi aplicado o padrão de massa molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa; Fermentas Life Sciences, EUA). As corridas eletroforéticas foram realizadas em cubas de acrílico contendo tampão de corrida (25mM de Tris-HCl pH 8,4, 115mM de glicina, SDS 0,1%), sob voltagem de 100 Volts, durante 3 à 4 horas.

3.6.2. Western blot

Após a corrida eletroforética, o gel foi preparado para a transferência (BioRad Trans-Blot SD Cell, EUA) de acordo com o método descrito por Towbin et al. (1979). Inicialmente, o gel e a membrana de nitrocelulose foram colocados na solução de transferência (48mM de Tris, 39 mM 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, a 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 (aproximadamente 12 horas) à 4°C com anticorpos primários para detecção da μ -calpaína (1:50; anticorpo de cabra anti μ -calpaina – Santa Cruz), da calpastatina (1:50; anticorpo de cabra anti-calpastatina – Santa Cruz), e da atrogina-1 (1:2.500; anticorpo de coelho anti-atrogina-1 foi gentilmente cedido pelo Dr. Stewart H. Lecker, Renal Unit, Beth Israel Deaconess Medical Center, EUA).

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 a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-IgG ligado a peroxidase (anti-IgG de cabra, diluição de 1:5.000 em TBS-T para a μ -calpaina e calpastatina; anti-IgG de camundongo e 1:5.000 para as demais proteínas). Após lavagem das membranas para remoção do excesso de anticorpo secundário não ligado, a membrana foi revelada com filme auto-radiográfico 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

Quimioluminescencia 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).

3.7. Determinação da taxa de oxidação de glicose em músculos esqueléticos de ratos

A taxa de oxidação de U-¹⁴C-glicose foi determinada em músculos *soleus* e EDL de ratos *sham* e desnervados. Os músculos foram incubados em tampão Krebs Ringer bicarbonato pH 7,4 contendo 5 mM de glicose. Após período de 1 hora de pré-incubação, o meio foi substituído por meio de igual constituição contendo U-¹⁴C-glicose (0,50 μ Ci/ μ mol) e os músculos foram incubados por mais 2 horas a 37° C com agitação constante. Os frascos foram fechados com rolha de borracha contendo um coletor de plástico com papel filtro sanfonado (*Whatman* número 1 de 3 cm/1 cm) no seu interior. No final do período de incubação foram injetados através da rolha de borracha 0,25 ml de hiamina no coletor (para captar CO₂ liberado pelo músculo no meio de incubação) e 0,25 ml de ácido sulfúrico 6N no compartimento principal do frasco, a fim de baixar o pH e interromper as reações tissulares. Para que todo CO₂ seja absorvido pela hiamina os frascos permaneceram fechado de 1 à 2 horas, quando, então, a rolha de borracha foi retirada. Foram colocadas de duas a três gotas de metanol (para ajudar a dissolução da hiamina) no coletor de plástico, o qual foi então transferido para um frasco de cintilação já contendo 10 ml de coquetel de cintilação com tolueno e PPO (5%) para contagem da radioatividade em um contador β de cintilação líquida *Beckman* LS 9800.

3.8. Determinação do conteúdo e da velocidade de síntese do glicogênio muscular

Para a determinação do conteúdo de glicogênio muscular foram utilizados músculos *soleus* e EDL de ratos *sham* e desnervados alimentados os quais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram seus músculos rapidamente retirados e colocados em tubos de centrífuga contendo 2 ml de KOH 30% para extração (SJÖGREN et al., 1938) e determinação do conteúdo de glicogênio muscular pelo método da antrona segundo Carrol et al. (1956).

Para a determinação da velocidade de síntese de glicogênio muscular os músculos *soleus* e EDL foram incubados em tampão Krebs Ringer bicarbonato pH 7,4 contendo 5 mM de glicose. Após período de 1 hora de pré-incubação, o meio foi substituído por meio de igual constituição contendo U-¹⁴C-glicose (0,50 μ Ci/ μ mol) e os músculos foram incubados por mais 2 horas a 37° C com agitação constante. No final do período de incubação foram injetados 0,25 ml de ácido sulfúrico 6N no compartimento principal do frasco, a fim de baixar o pH e interromper as reações tissulares. Os músculos foram lavados para a remoção do excesso de meio radioativo e, então, colocados em tubos de centrífuga contendo 2 ml de KOH 30% para extração (SJÖGREN et al., 1938). Ao final do processo de extração, uma alíquota da amostra foi transferida para um frasco de cintilação já contendo 1 ml de coquetel de cintilação com tolueno e PPO (5%) para contagem da radioatividade em um contador β de cintilação líquida *Beckman LS 9800*.

3.9. Determinação da atividade da Adenilil Ciclase

3.9.1. Preparação de membrana de músculos esqueléticos

Os músculos EDL de ratos *sham* e desnervados foram homogeneizados em 10 volumes

de tampão Tris 12,5 mM, pH 7,4; contendo EDTA 1 mM; fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1 mM e pepstatina A 1 μ M, e então centrifugados a 20.000 x g por 10 min a 4° C. O precipitado obtido foi ressuspensão no mesmo tampão e submetido a mesma etapa de centrifugação por mais duas vezes. O precipitado final foi ressuspensão em 5 volumes do mesmo tampão, sendo uma amostra utilizada para determinação de conteúdo protéico (Bradford, 1976) e outra armazenada a -80° C.

3.9.2. *Atividade da adenilil ciclase*

Para a realização da atividade da adenilil ciclase, 10 μ g de membranas foram incubadas a 30° C na presença da seguinte mistura reacional (concentrações finais): ATP 0,6 mM em solução Tris 12,5 mM , pH 7,4; contendo GTP 1 μ M, MgCl₂ 10 mM , IBMX 1 mM e BSA 1 mg/mL. Os ensaios foram realizados na presença ou ausência do ativador forskolina (10 μ M), em um volume final de 200 μ l por tubo. Após 30 min, a reação foi interrompida por fervura por 10 min e em seguida foram centrifugadas a 20.000 X g por 15 minutos. O sobrenadante foi armazenado à -80° C e posteriormente utilizado para quantificação do AMPc.

3.9.3. *Quantificação do AMPc produzido*

A quantificação do AMPc formado foi realizada por método radiométrico utilizando kit de quantificação de AMPc (Amershan). O método consiste na competição entre o AMPc das amostras e 180 pmol de [3H]AMPc por proteína ligadora de AMPc. A curva padrão de AMPc foi construída utilizando concentrações conhecidas de AMPc (0,5;1;2;4;8 e 16 pmol/l). Os resultados foram expressos em AMPc por μ g de proteína.

3.10. Ativação da proteína G

3.10.1. Preparação de membranas para os ensaios de ligação do [³⁵S]GTPγS

Os músculo EDL de ratos *sham* e desnervados foram pesados e homogeneizados sucessivamente em homogeneizador Ultra-Turrax de vidro, na concentração de 100 mg de tecido/mL de tampão A contendo Tris HCl 50 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM e NaCl 100 mM, acrescido de sacarose 0,32 M. As amostras foram centrifugadas a 1.000 x g por 15 minutos, a 4°C. O processo foi repetido e os sobrenadantes provenientes das duas centrifugações foram misturados e submetidos à ultracentrifugação por 30 min a 20000 x g (4°C). As membranas musculares precipitadas foram ressuspensas em tampão A (5 volumes) e congeladas a -70°C. Foi retirada uma alíquota de cada amostra para dosagem do conteúdo protéico pelo método de Bradford (1976).

3.10.2 Ensaio de ligação do [³⁵S]GTPγS em preparação de membranas

Os ensaios de ligação do [³⁵S]GTPγS foram realizados incubando-se as membranas a 37°C, em tampão A (EGTA 0,2 mM) num volume final de 200 μL. Para análise da ativação de proteínas G mediada por GPCR, as membranas foram incubadas com isopreterenol na presença de GDP exógeno e os valores foram expressos em porcentagem de estímulo em relação à ligação basal do radioligante. Já para a quantificação do total de proteínas G presentes na preparação de membranas, estas foram incubadas sem a adição de GDP ao meio de incubação.

A ligação inespecífica do [³⁵S]GTPγS foi determinada na presença de 50 μM de GTPγS não marcado. O radioligante livre foi retirado por centrifugação das amostras por 20 minutos a 15.000 x g (4°C), por 3 vezes.

3.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como Média \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 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 - Resultados

4.1. Concentrações de noradrenalina muscular

Com o intuito de averiguar o grau de eficiência do modelo de desnervação simpática utilizado, o conteúdo de noradrenalina foi quantificado em diversos músculos esqueléticos das patas esquerda e direita de ratos jovens (~70g) e adultos (~200g), em diferentes tempos após o procedimento cirúrgico. Como pode ser observado na figura 2, as concentrações de noradrenalina em músculos EDL, *soleus* e tibial anterior foram significativamente reduzidas (~80 a 85%), em ambas as patas posteriores dos animais jovens, 3 dias após a desnervação simpática lombar (figuras 2A, B e C, respectivamente). Resultados semelhantes foram obtidos em músculos EDL, 7 dias após a desnervação (figura 2D). Músculos *soleus* e EDL de ratos adultos também apresentaram redução significativa (80-90%) nas concentrações de noradrenalina, 3 dias após a desnervação (figura 3). Interessante observar que as concentrações de noradrenalina em músculos de ratos adultos são menores às encontradas em músculos de ratos jovens, indicando que a atividade simpática no músculo esquelético diminui com o envelhecimento do animal (figura 3).

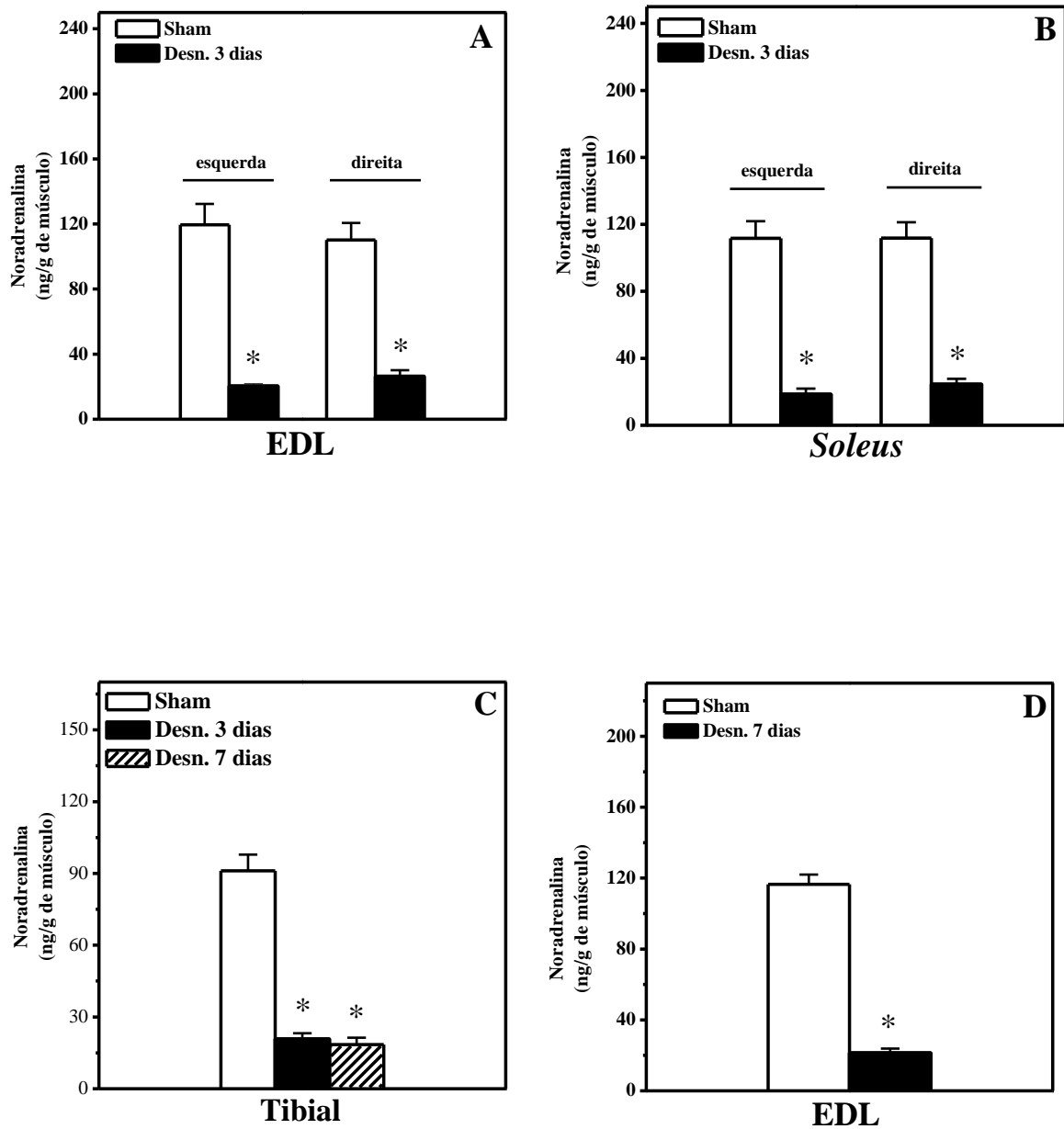


Figura 2. Efeito da desnervação simpática lombar nas concentrações de noradrenalina em músculos EDL (A), *soleus* (B) e tibial anterior (C) de ratos jovens (~70g), 3 dias após o procedimento cirúrgico, e EDL (D) de ratos alimentados, 7 dias após a desnervação. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=7). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham*.

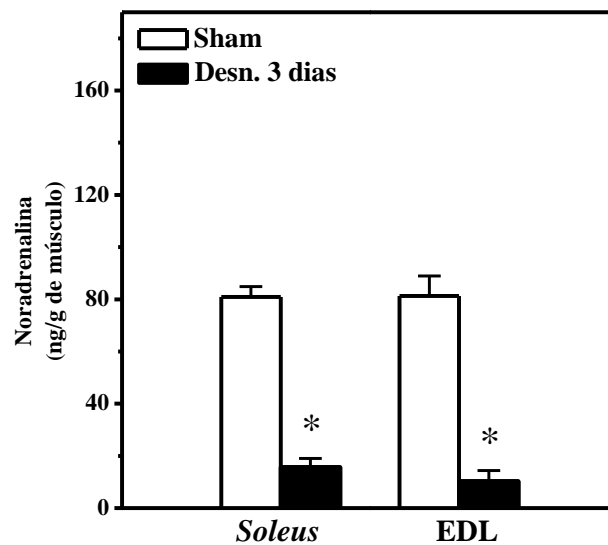


Figura 3. Efeito da desnervação simpática lombar (3 dias) nas concentrações de noradrenalina em músculos *soleus* e EDL de ratos adultos (~200g). Os valores são expressos como média \pm EPM (n=7). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham*.

4.2. Massa muscular, tipagem, área seccional transversa e densidade capilar das fibras musculares esqueléticas

Como pode ser observada na tabela 5, a massa de músculos EDL e *soleus* não foi alterada após 3, 7, ou 15 dias da desnervação simpática lombar. Corroborando esses resultados, a desnervação também não modificou a área seccional transversa (figura 4B e 5B) e a porcentagem dos três tipos de fibras (figuras 4A e 5A) identificadas tanto em músculos EDL quanto *soleus* de ratos, 15 dias após o procedimento cirúrgico.

A desnervação simpática lombar, além de remover a inervação direta das fibras musculares dos músculos esqueléticos dos animais, remove também a inervação simpática dos vasos sanguíneos que os irrigam. Uma vez que tem se demonstrado na literatura que a noradrenalina liberada pelas fibras nervosas simpáticas podem contribuir para a angiogênese e o crescimento de vasos colaterais em modelos de isquemia tecidual (CHALOTHORN et al., 2005), avaliou-se neste estudo as possíveis alterações na densidade capilar em músculos

soleus de ratos desnervados, após 15 dias da cirurgia. Interessante notar que a desnervação simpática lombar reduziu (~10%) o número de capilares sanguíneos por fibra muscular dos músculos *soleus* dos animais desnervados quando comparados a seus controles (figura 6).

Tabela 5. Efeito da desnervação simpática lombar na massa (mg/100g de massa corporal) de músculos *soleus* e EDL de ratos alimentados 3, 7 e 15 dias após a cirurgia. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=7).

<i>Tempo de desnervação</i>	<i>Soleus</i>		EDL	
	<i>Sham</i>	<i>Desnervado</i>	<i>Sham</i>	<i>Desnervado</i>
3 dias	49,6 \pm 1,6	47,8 \pm 1,3	42,3 \pm 1,2	44,4 \pm 1,0
7 dias	51,1 \pm 1,3	49,6 \pm 1,3	41,3 \pm 0,9	42,6 \pm 1,2
15 dias	68,6 \pm 2,8	62,2 \pm 2,8	61,4 \pm 1,7	57,5 \pm 2,8

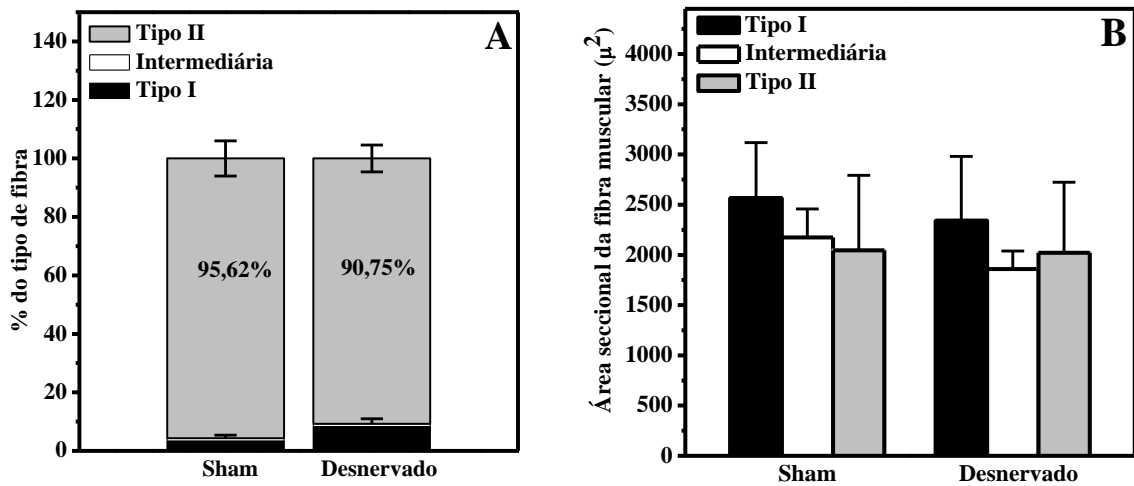


Figura 4. Efeito da desnervação simpática lombar no tipo (A) e na área de secção transversa (B) das fibras que compõem o músculo EDL, 15 dias após o procedimento cirúrgico. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=7).

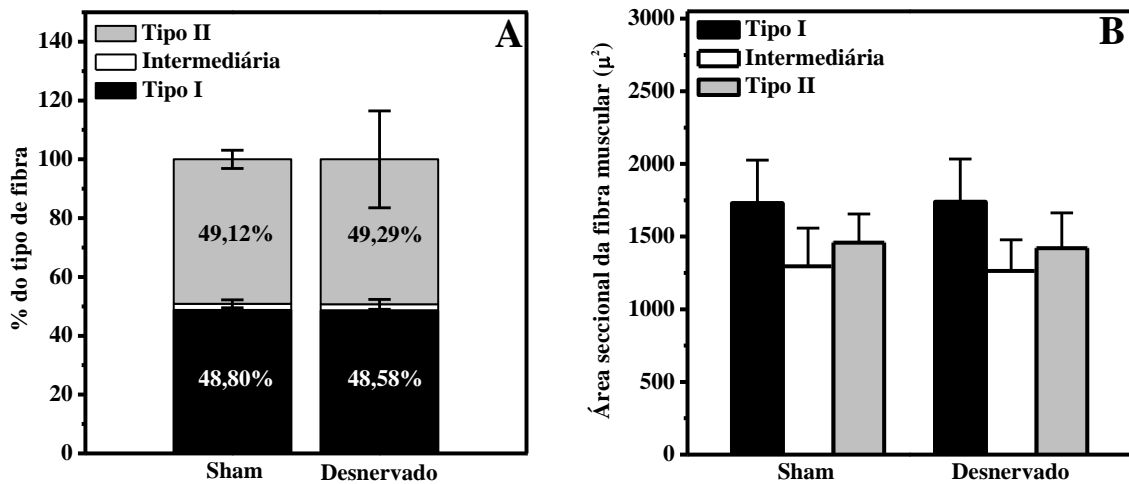


Figura 5. Efeito da desnervação simpática lombar no tipo (A) e na área de secção transversa (B) das fibras que compõem o músculo *soleus*, 15 dias após o procedimento cirúrgico. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=7).

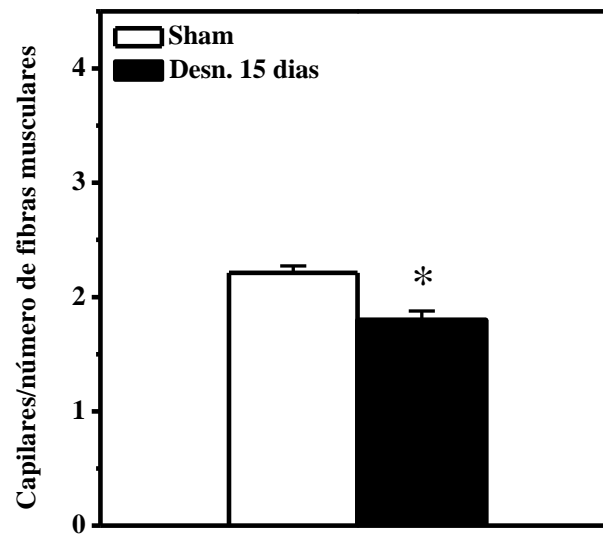


Figura 6. Efeito da desnervação simpática lombar na densidade de capilares por fibra muscular em músculos *soleus* de ratos alimentados, 15 dias após a desnervação simpática lombar. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=7). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham*.

4.3. Proteólise total e atividades dos sistemas proteolíticos em músculos esqueléticos de ratos alimentados e jejuados

Sabendo-se que as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) exercem um papel antiproteolítico no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos normais *in vitro*, o presente trabalho investigou o papel fisiológico das fibras simpáticas que inervam diretamente o tecido muscular na regulação da proteólise total e nas atividades dos diferentes sistemas proteolíticos em músculos *soleus* e EDL de ratos, 3 e 7 dias após o procedimento cirúrgico.

4.3.1. Proteólise total

A proteólise total reflete a soma de todos os sistemas proteolíticos envolvidos com a degradação protéica intracelular. Assim, 3 dias após a desnervação, verificou-se uma redução na proteólise total de 13% e 10% em músculos *soleus* e EDL, respectivamente (figura 7). Portanto, a desnervação simpática lombar afeta o metabolismo protéico tanto em músculos tipicamente oxidativos como glicolíticos.

Com o objetivo de investigar se estes efeitos antiproteolíticos são também observados em situações experimentais que sabidamente aumentam a degradação protéica, como no jejum de 48 horas, avaliou-se a proteólise total em músculos de ratos alimentados e jejuados, 7 dias após a desnervação. O modelo de 7 dias foi utilizado neste trabalho para que os animais tivessem tempo suficiente para se recuperar completamente da cirurgia e, dessa forma, pudessem ser submetidos ao jejum de 48 horas, uma vez que tal situação não seria possível de ser induzida em animais com apenas 3 dias após o procedimento cirúrgico.

Como esperado, o jejum aumentou (~ 46%) a proteólise total em músculos EDL de animais *sham*, mas não afetou a liberação de tirosina em músculos *soleus* (figura 8A e B, respectivamente). Pode-se observar que o efeito antiproteolítico da desnervação simpática lombar perdurou até o sétimo dia da cirurgia em músculos EDL de animais alimentados, sendo a degradação protéica total reduzida em ~20% (figura 8A). O mesmo efeito foi observado em músculos EDL de animais expostos ao jejum de 48 horas, os quais apresentaram uma redução de 11% na degradação protéica total quando comparados aos animais *sham* (figura 8A). A degradação protéica total em *soleus*, por outro lado, não foi diferente entre os animais *sham* e desnervados, 7 dias após a cirurgia (figura 8B). Estes resultados, em conjunto, indicam que a desnervação simpática é capaz de reverter parcialmente o efeito proteolítico induzido pelo jejum em músculos EDL.

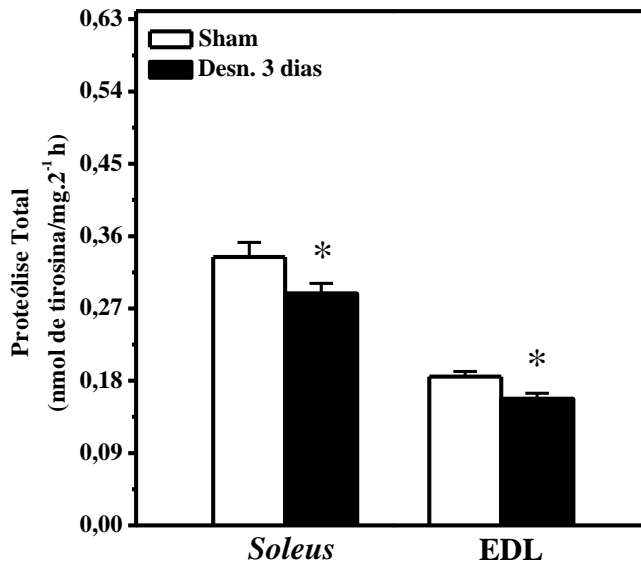


Figura 7. Efeito da desnervação simpática lombar (3 dias) na proteólise total em músculos *soleus* e EDL de ratos alimentados. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=7). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham*.

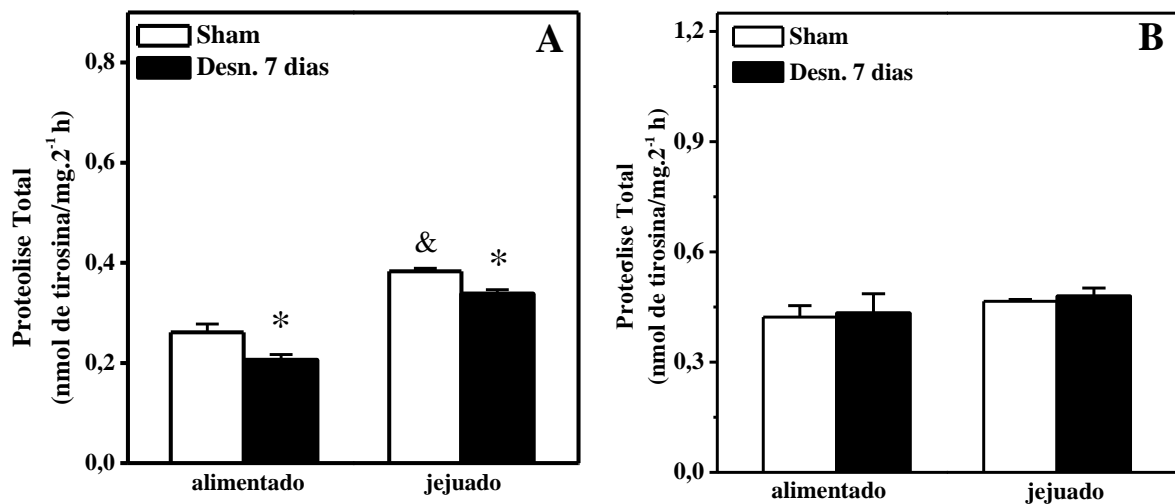


Figura 8. Efeito da desnervação simpática lombar (7 dias) na proteólise total em músculos EDL (A) e *soleus* (B) de ratos alimentados e jejuados (48hs). Os valores são expressos como média \pm EPM (n=6). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham*; & $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham* alimentado.

Considerando que a desnervação simpática lombar alterava a degradação total de proteínas em músculos esqueléticos de ratos alimentados e jejuados, avaliou-se, em seguida, qual (s) sistema (s) proteolítico (s) era responsável pelo efeito antiproteolítico observado.

4.3.2. Atividade proteolítica do sistema dependente de Ub-proteassoma e expressão das Ub-ligases

A atividade do sistema dependente de Ub-proteassoma foi avaliada em músculos esqueléticos de animais alimentados e jejuados (48hs), em diferentes tempos após a desnervação. Após 3 dias da desnervação, observou-se uma importante tendência ($p < 0,06$) à redução na atividade deste sistema em músculos de animais desnervados (figura 9A).

Sabendo-se que a atividade do sistema Ub-proteassoma é extremamente aumentada pelo jejum e participa da degradação de proteínas nessa condição, avaliou-se a atividade deste sistema em músculos EDL de ratos alimentados e jejuados, no sétimo dia após a desnervação simpática lombar. Como pode ser observada na figura 9B, a atividade proteolítica não se alterou em músculos EDL de ratos alimentados sete dias após a desnervação. Entretanto, da mesma maneira que acontecera com a degradação protéica total (figura 8A), a desnervação preveniu o aumento na atividade do sistema Ub-proteassoma em músculos EDL de ratos jejuados (figura 9B). Vale à pena ressaltar que a perda de massa muscular causada pelo jejum não foi alterada pela desnervação (dados não mostrados).

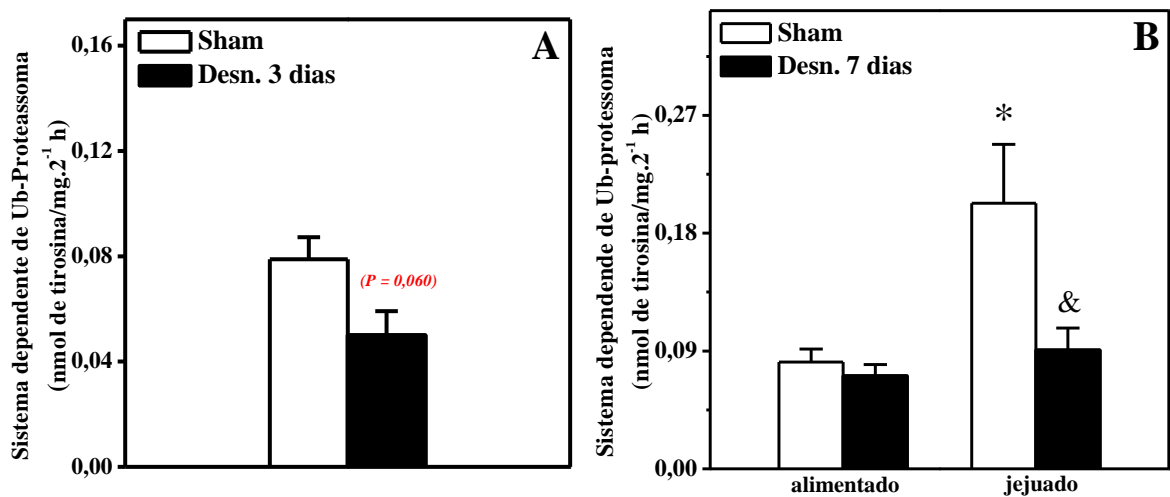


Figura 9. Atividade proteolítica do sistema dependente de Ub-proteassoma em músculos EDL de ratos alimentados 3 dias após a desnervação (A) e de ratos alimentados e jejuados durante 48 horas, 7 dias após a desnervação simpática lombar (B). Os valores são expressos como média \pm EPM (n=6). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham* alimentado; & $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham* jejuado.

Em músculos *soleus*, embora exista uma redução na degradação protéica total 3 dias após a desnervação, o sistema responsável por este efeito parece não ser aquele dependente de Ub-proteassoma, uma vez que sua atividade não sofreu alteração em músculos de ratos alimentados no terceiro ou sétimo dia após a desnervação, ou mesmo quando estes animais foram submetidos ao jejum de 48 horas (figuras 10A e B).

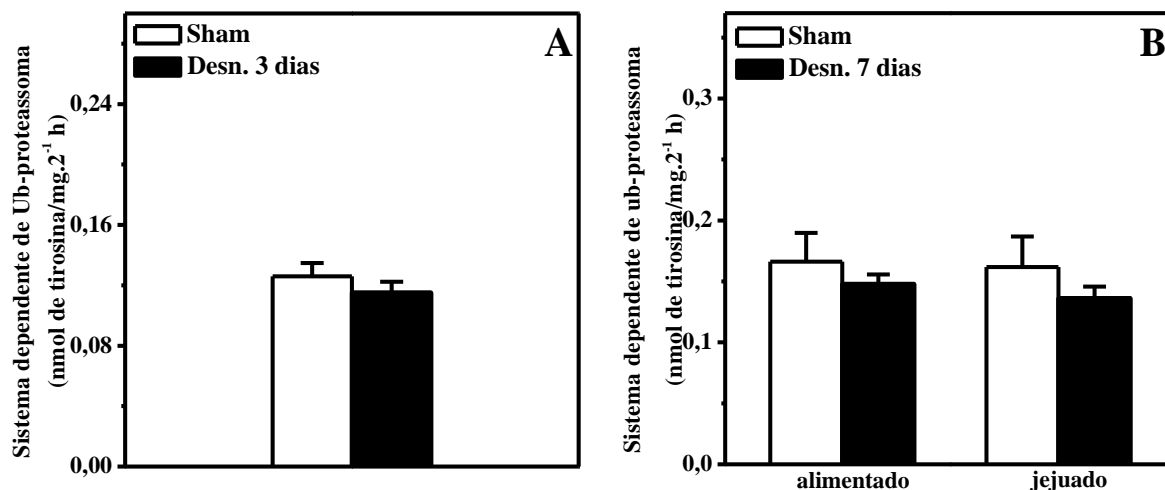


Figura 10. Atividade proteolítica do sistema dependente de Ub-proteassoma em músculos *soleus* de ratos alimentados, 3 dias após a desnervação (A) e de ratos alimentados e jejuados durante 48 horas, 7 dias após a desnervação simpática lombar (B). Os valores são expressos como média \pm EPM (n=6).

Em seguida, avaliou-se a expressão gênica das E3-ligases (atrogina-1 e MurF-1) em músculos EDL de ratos alimentados, 3 e 7 dias após a desnervação simpática lombar. Como pode ser observada na figura 11, a desnervação alterou a expressão gênica das duas E3-ligases. Embora não tenha reduzido a expressão do RNAm da atrogina-1 (figura 11A), a desnervação simpática lombar por 3 dias foi capaz de reduzir (~75%) a expressão gênica da MuRF-1 (figura 11B). Além disso, a desnervação por 7 dias reduziu (~70%) a expressão gênica de ambas as E3-ligases (figuras 11). Dessa forma, esses dados indicam que a desnervação simpática lombar reduz a atividade do sistema Ub-proteassoma, devido, pelo menos em parte, à inibição do processo de ubiquitinação regulado pelas E3-ligases.

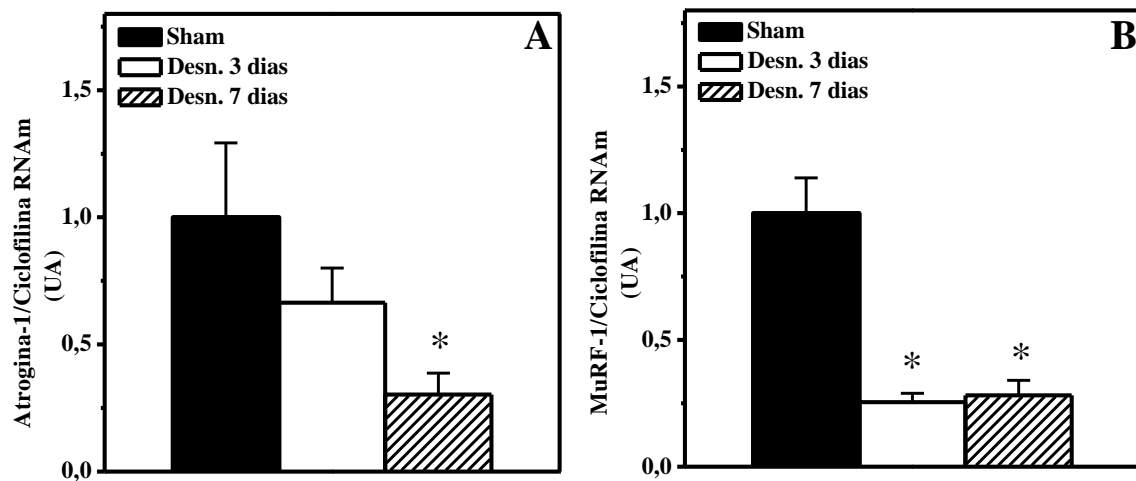


Figura 11. Expressão gênica da atrogina-1 (A) e MuRF-1 (B) (relativo à ciclofilina) em músculos EDL de ratos alimentados, 3 e 7 dias após a desnervação simpática lombar. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=5-6). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham*.

4.3.3. Atividade proteolítica do sistema dependente de Ca^{+2} e conteúdo das calpaínas e calpastatina

Uma vez que estudos anteriores de nosso laboratório utilizando outros modelos de simpatectomia demonstraram que o SNS exerce uma inibição tônica na atividade do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} em músculo *soleus*, avaliou-se a atividade máxima deste sistema em músculos *soleus* e EDL de ratos, 3 dias após a desnervação simpática lombar.

Como pode ser observada na figura 12A, a desnervação não alterou a atividade máxima do sistema dependente de Ca^{+2} em músculos EDL de ratos, 3 dias após o procedimento cirúrgico. Em músculos *soleus*, por outro lado, a desnervação simpática lombar por 3 dias aumentou (~145%) a atividade máxima deste sistema (figura 12B).

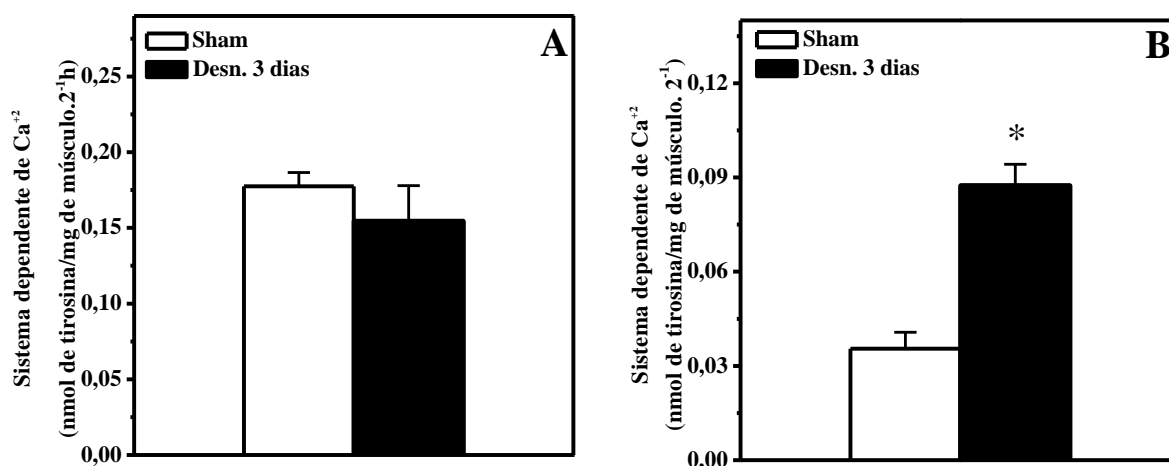


Figura 12. Atividade do sistema dependente de Ca⁺² em músculos EDL (A) e *soleus* (B) de ratos alimentados, 3 dias após a desnervação simpática lombar. Os valores são expressos como média ± EPM (n=6). * P≤0,05 em relação ao grupo *sham*.

Em seguida, investigou-se as possíveis alterações dos componentes desse sistema em músculos esqueléticos de ratos submetidos à desnervação simpática lombar, 3 e 7 dias após o procedimento cirúrgico. Para isso, quantificou-se o conteúdo protéico da μ -calpaína, uma protease dependente de Ca⁺², em suas formas autolisada, não autolisada e total (soma das formas autolisada e não autolisada da μ -calpaína), assim como o conteúdo protéico da calpastatina, o inibidor endógeno desta protease.

A desnervação simpática lombar por 3 dias resultou em aumento (~140%) da forma autolisada da μ -calpaína, assim como no conteúdo total desta protease em músculos *soleus* de ratos (figura 13). Um perfil de resposta aparentemente similar foi observado em *soleus* desnervados, durante 7 dias, entretanto, estes valores não foram estatisticamente diferentes aos dos animais *sham* (figura 13). Diferentemente do *soleus*, o conteúdo da μ -calpaína em músculos EDL não foi alterado, 3 dias após a desnervação simpática lombar (figura 14). Entretanto, o conteúdo da forma autolisada desta protease foi aumentado (~78%), 7 dias após a desnervação.

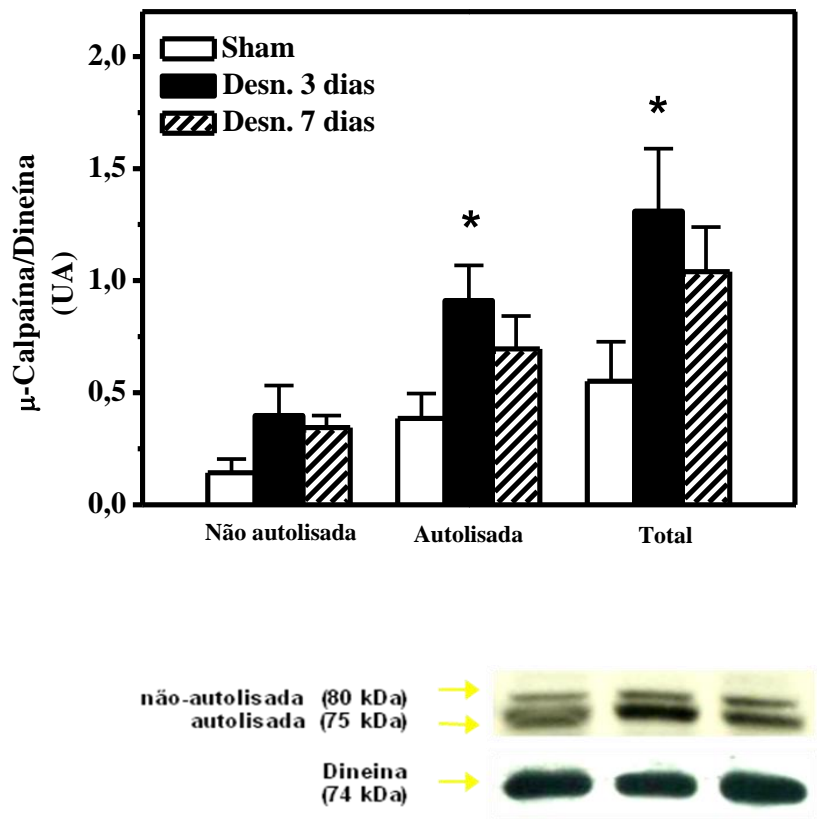


Figura 13. Conteúdo protéico da μ -calpaína na sua forma não autolisada, autolisada e total (relativo à dineína) em músculos *soleus* de ratos, 3 e 7 dias após o procedimento cirúrgico. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=5-6). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham*.

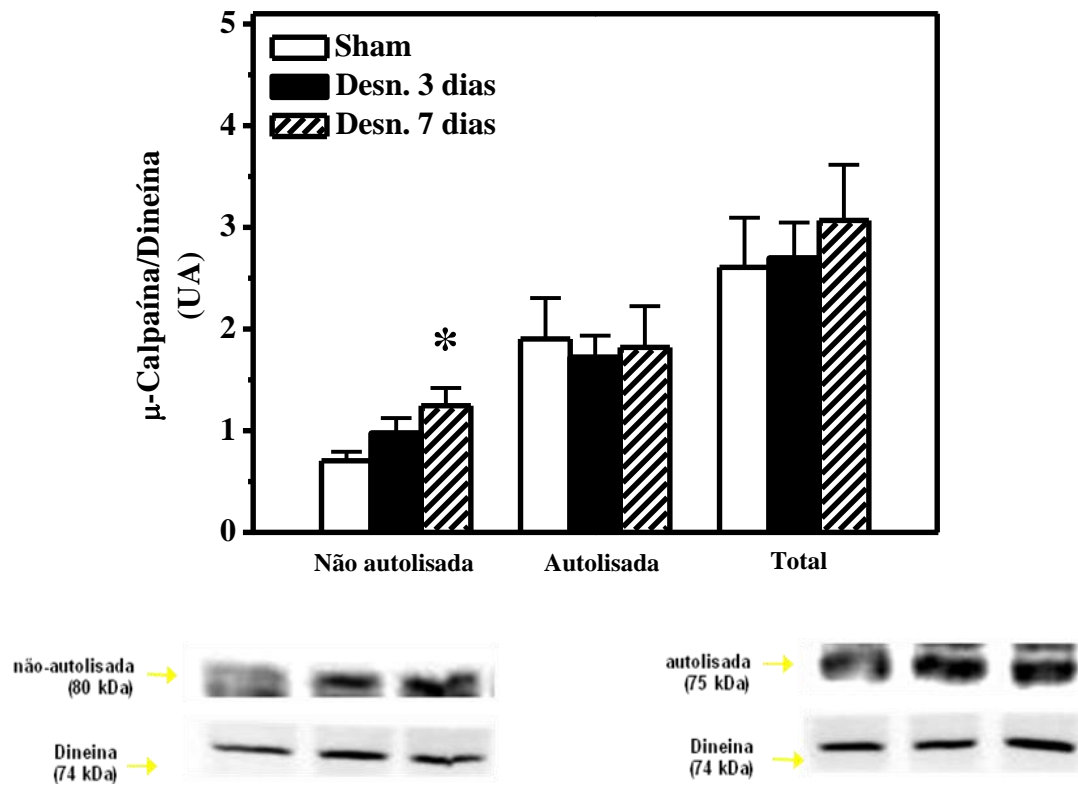


Figura 14. Conteúdo protéico da μ -calpaína na sua forma não autolisada, autolisada e total (relativo à dineína) em músculos EDL de ratos desnervados por 3 e 7 dias. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=5-6). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham*.

Sabendo-se que a calpastatina é o inibidor endógeno das calpaínas e, desta maneira, poderia estar modulando o conteúdo protéico destas proteases, avaliou-se também no presente estudo o conteúdo desta proteína em músculos esqueléticos de ratos desnervados. Como pode ser observado na figura 15, não houve alteração no conteúdo protéico da calpastatina em músculos *soleus* e EDL, após 3 ou 7 dias da desnervação simpática lombar. A expressão gênica da calpastatina em músculos *soleus* também não foi alterada, após 3 dias da desnervação (dados não apresentados).

Em conjunto, estes dados sugerem que o aumento da atividade máxima do sistema proteolítico dependente de cálcio observada em músculos *soleus* de animais submetidos à desnervação simpática lombar foi provavelmente devido à maior atividade enzimática das μ -calpaínas, sem envolver alterações no conteúdo da calpastatina.

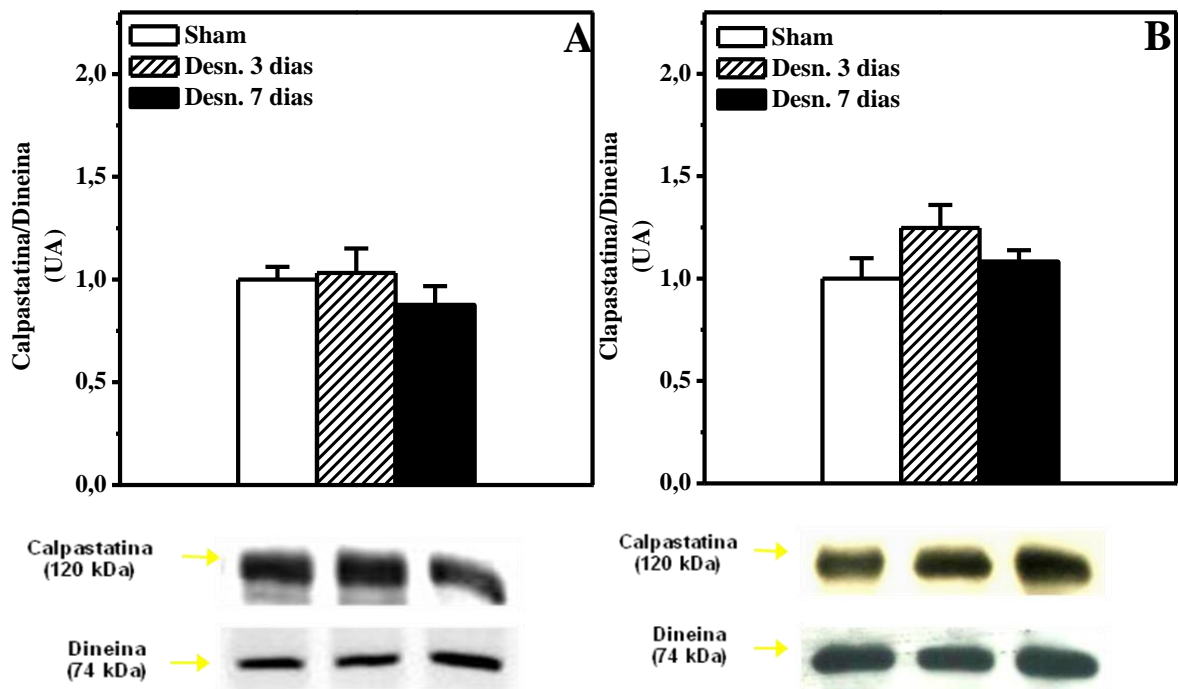


Figura 15. Conteúdo da calpastatina (relativo à dineína) em músculos *soleus* (A) e EDL (B) de ratos alimentados, 3 e 7 dias após a desnervação simpática lombar. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=5-6).

4.3.4. Atividade do sistema lisossomal e expressão da LC3

A depleção de noradrenalina muscular não afetou a atividade do sistema lisossomal em músculos EDL de ratos, 3 dias após a cirurgia (figura 16). Além da determinação da atividade proteolítica lisossomal, investigou-se a expressão gênica da LC3, uma proteína chave na formação do autofagossomo e, por essa razão, considerada um marcador de atividade autofágica em diversos tecidos. Como apresentado na figura 17, a expressão gênica da LC3 foi reduzida (~65%) pela desnervação simpática lombar, 3 e 7 dias após a cirurgia. Esse resultado sugere que o sistema lisossomal/via autofágica pode ser modulação pelo SNS na musculatura esquelética de roedores alimentados.

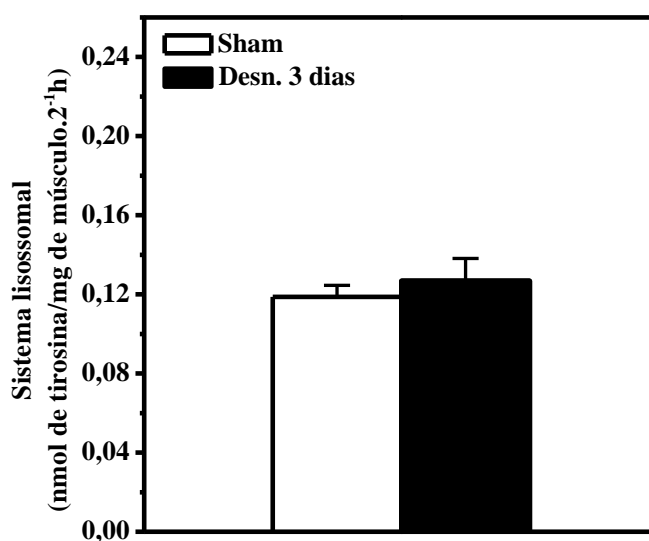


Figura 16. Atividade proteolítica do sistema lisossomal em músculos EDL de ratos alimentados, 3 dias após a desnervação simpática lombar. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=5-7).

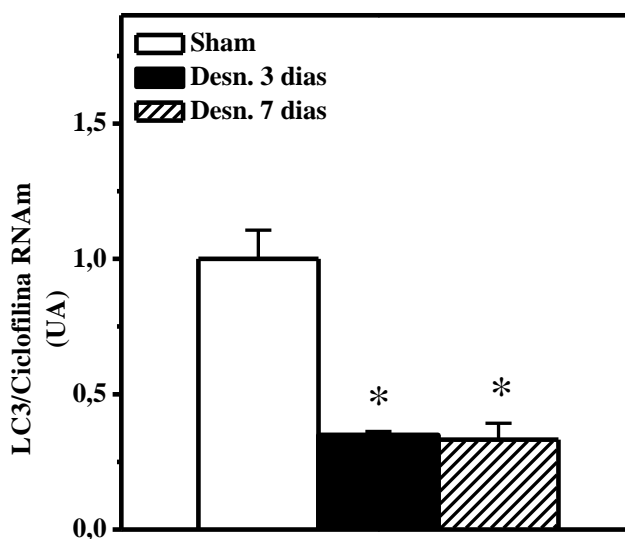


Figura 17. Expressão gênica da LC3 (relativo à ciclofilina) em músculos EDL de ratos, 3 e 7 dias após a desnervação simpática lombar. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=5-6). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham*.

4.4. Atividade e conteúdo de componentes da via de sinalização β -adrenérgica em músculos esqueléticos de ratos

Após se demonstrar que a desnervação simpática lombar resultava em inibição da proteólise, principalmente em músculos EDL de ratos alimentados e jejuados, algumas hipóteses foram aventadas no sentido de explicar as alterações observadas nestes tipos de músculos. Uma das possibilidades é que estes efeitos antiproteolíticos fossem resultantes dos fenômenos clássicos de hipersensibilidade adrenérgica à desnervação. Para se testar essa hipótese, quantificou-se o conteúdo de AMPc, a atividade da adenilil ciclase, assim como o conteúdo e atividade (basal e estimulada) da proteína G em músculos EDL de ratos, 3 dias após a remoção da inervação simpática.

A figura 18A apresenta os resultados do conteúdo de AMPc em músculos EDL de ratos *sham* e desnervados por 3 dias. Pode-se notar que o conteúdo deste segundo mensageiro aumentou em quase 3 vezes em músculos EDL de ratos desnervados (figura 18A). Assim

como o AMPc, a atividade da adenilil ciclase, a enzima responsável pela síntese intracelular deste segundo mensageiro estava aumentada em mais de 2 vezes em músculos EDL de ratos desnervados (figura 18B). Como pode ser observado nas figuras 19A e B, o conteúdo total e a atividade basal da proteína G em músculos EDL de ratos desnervados não foram alterados pela desnervação. O isoproterenol foi capaz de aumentar em até 137% a atividade da proteína G tanto em músculos *sham* quanto em músculos desnervados não havendo, portanto, diferença na atividade máxima desta proteína entre os grupos (figura 20).

Estes dados indicam que o músculo EDL de ratos submetidos à desnervação simpática lombar desenvolve hipersensibilidade adrenérgica após 3 dias da cirurgia, cujos mecanismos envolvem maior atividade enzimática da adenilil ciclase e aumento dos níveis intracelulares de AMPc.

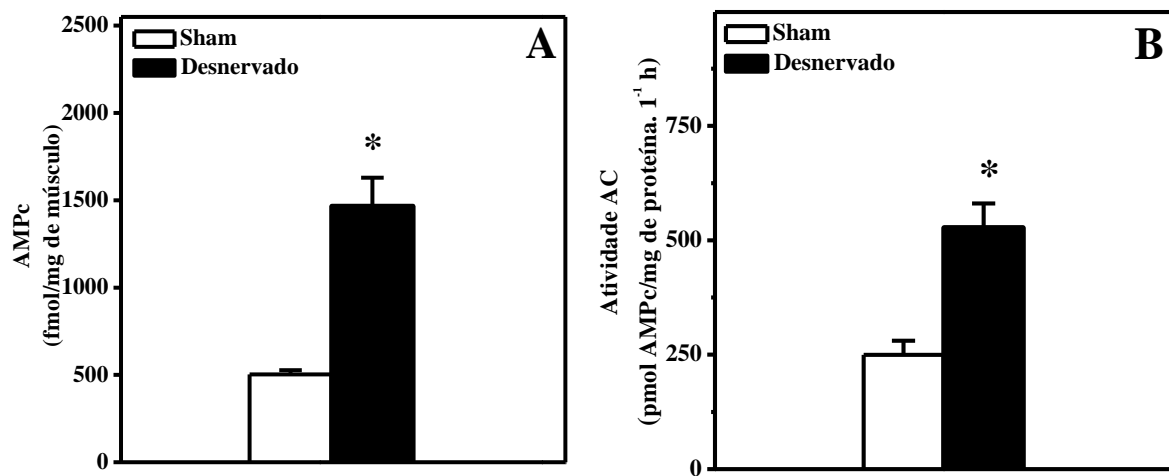


Figura 18. Concentração intracelular de AMPc (A) e atividade da adenilil ciclase (B) em músculos EDL de ratos *sham* e desnervados, 3 dias após o procedimento cirúrgico. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=6). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham*.

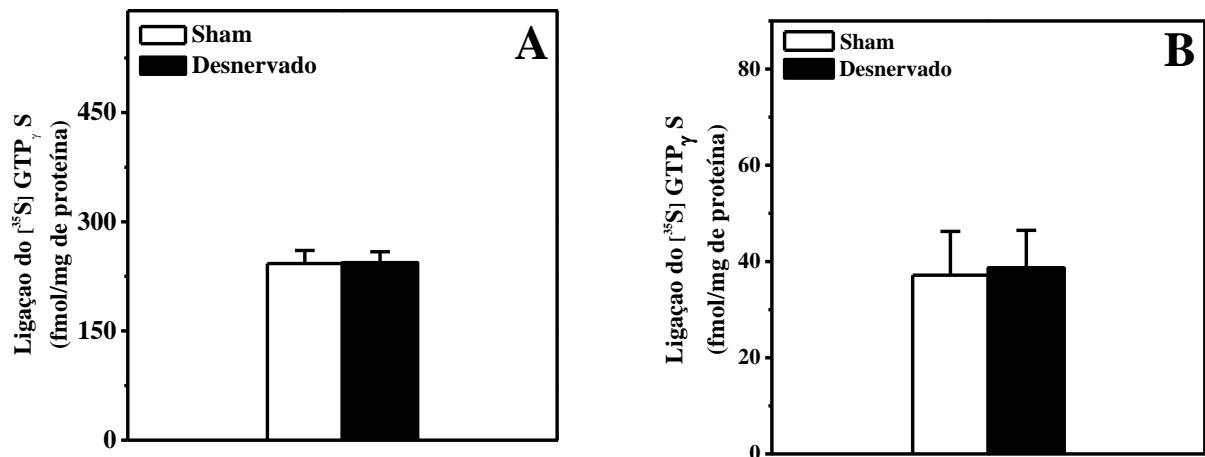


Figura 19. Quantidade (A) e atividade basal de proteína G (B) em músculos EDL de ratos *sham* e desnervados, 3 dias após o procedimento cirúrgico. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=6).

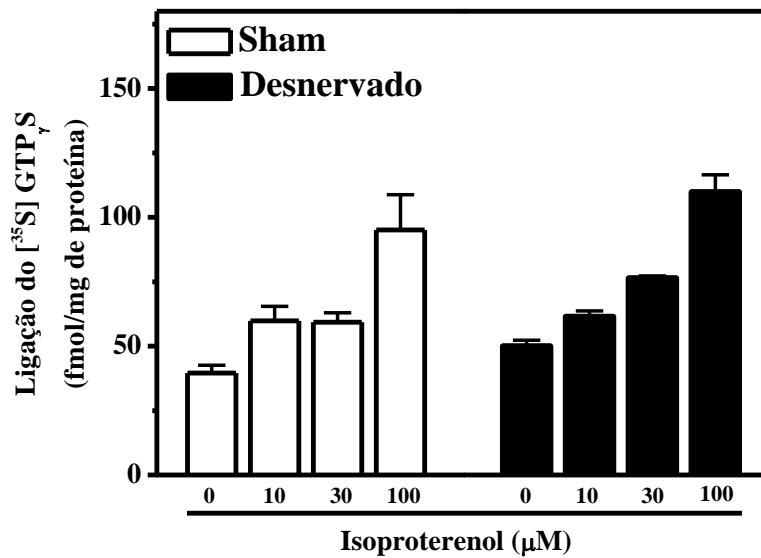


Figura 20. Ativação da proteína G estimulada por concentrações crescentes de isoproterenol em músculos EDL de ratos *sham* e desnervados, 3 dias após o procedimento cirúrgico. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=6).

4.5. Alterações do metabolismo de carboidratos

Para investigar possíveis alterações do metabolismo de carboidratos, o conteúdo e fluxo da via de síntese de glicogênio, assim como a oxidação de glicose em músculos *soleus* e EDL de ratos desnervados, foram avaliados 3 dias após o procedimento cirúrgico. A desnervação simpática lombar não alterou o conteúdo total de glicogênio em músculos *soleus* e EDL de ratos, 3 dias após a cirurgia (figura 21A). Por outro lado, a velocidade na via de síntese de glicogênio estimada pela incorporação de glicose marcada (^{14}C -glicose) em glicogênio apresentou-se aumentada (~70%) em músculos EDL, mas não em músculos *soleus* de ratos, 3 dias após a desnervação simpática lombar (figura 21B).

Em condições basais (músculos incubados sem insulina), não houve qualquer alteração na taxa de oxidação de glicose em músculos EDL de ratos desnervados por 3 dias. Interessante observar que muito embora a oxidação de glicose em músculos EDL de ratos *sham* não tenha sido alterada pela adição da insulina, a taxa de oxidação aumentou (~70%) nos músculos desnervados incubados na presença do hormônio (figura 22A). Em músculos *soleus*, cujo metabolismo é predominantemente oxidativo, a desnervação também não afetou a taxa de oxidação da glicose. A adição de insulina ao meio de incubação causou um aumento semelhante (~170%) nesse parâmetro metabólico tanto em músculos *sham* quanto desnervados por 3 dias (figura 22B). Dessa forma, estes resultados sugerem que a remoção da inervação simpática direta de músculos glicolíticos como o EDL possa torná-los mais sensíveis às ações metabólicas da insulina.

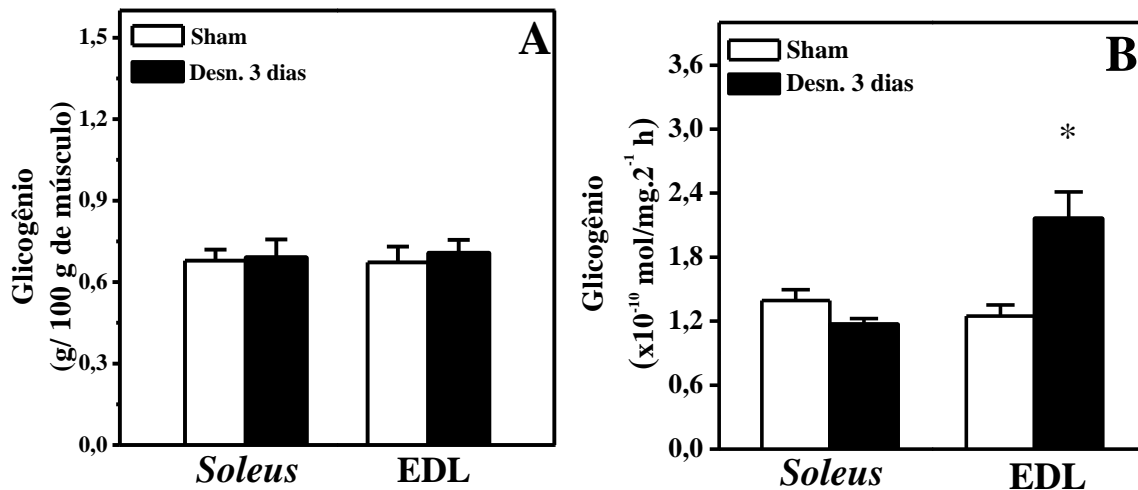


Figura 21. Conteúdo de glicogênio (A) e fluxo de glicose marcada para a síntese de glicogênio (B) em músculos *soleus* e EDL de ratos *sham* e desnervados, 3 dias após a desnervação simpática lombar. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=7). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham*.

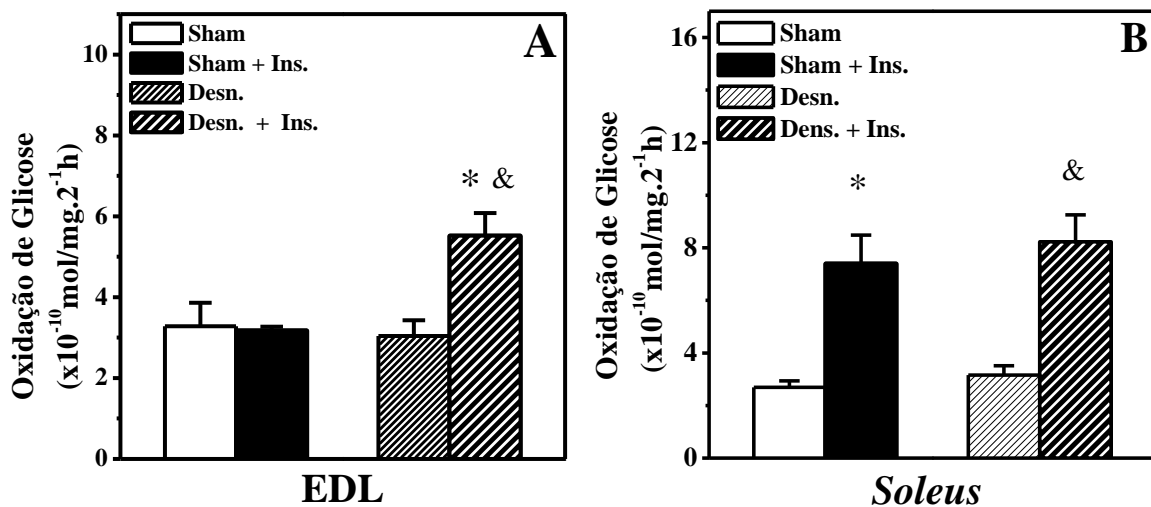


Figura 22. Oxidação de glicose em músculos EDL (A) e *soleus* (B) de ratos *sham* e desnervados, 3 dias após a desnervação simpática lombar. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=7). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo *sham*; & $P \leq 0,05$ em relação ao grupo desnervado.

5 - Discussão

Tendo em vista a falta de informações na literatura a respeito da função da inervação noradrenérgica nas propriedades metabólicas do músculo esquelético, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel fisiológico desta inervação no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos tipicamente oxidativos (*soleus*) e glicolíticos (EDL) de ratos, utilizando para isso o modelo experimental da desnervação simpática lombar. Os resultados mostram que a desnervação simpática exerce efeitos distintos de acordo com o tipo de músculo estudado. Dessa forma, a retirada da inervação simpática e, conseqüentemente, a redução nas concentrações de noradrenalina em músculos *soleus* resulta na ativação do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} e no aumento do conteúdo de suas proteases. Em músculos EDL, por outro lado, a desnervação causa hipersensibilidade adrenérgica com aumento na atividade da adenilil ciclase e no conteúdo de AMPc, associada à redução da degradação protéica dependente de Ub-proteassoma e na estimulação do metabolismo de glicose.

O nosso laboratório tem contribuído de forma importante para a compreensão do papel fisiológico do SNS no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos (NAVEGANTES et al., 2002). Para isso, têm-se utilizado duas técnicas de simpatectomia para o estudo das ações das catecolaminas no metabolismo protéico em músculos esqueléticos de roedores: a simpatectomia química induzida pelo tratamento com guanetidina e a simpatectomia cirúrgica de adrenodemedulação (NAVEGANTES et al., 2002). A guanetidina é um fármaco que inibe a liberação das vesículas contendo a noradrenalina dos axônios pós-ganglionares de fibras simpáticas que inervam diversos tecidos periféricos, dentre estes o músculo esquelético. De fato, a simpatectomia química induzida pelo tratamento com guanetidina por 4 dias reduziu as concentrações musculares de noradrenalina em até 95% (NAVEGANTES et al., 1999; BAVIERA et al., 2008). Pelo fato deste tratamento interferir

com a secreção hormonal das catecolaminas, não foi possível utilizar este modelo experimental para diferenciar qual dos componentes do simpático (neural ou hormonal) seria o responsável pelas alterações metabólicas observadas. Com o intuito de responder a esta questão, Navegantes et al. (2000) utilizaram a simpatectomia cirúrgica induzida pela adrenodemedulação, modelo no qual se remove apenas a porção medular da glândula adrenal, e concluíram que a adrenalina circulante era o principal mediador das ações adrenérgicas no controle do metabolismo protéico muscular de roedores. Entretanto, o papel exercido pelo componente neural do SNS neste controle permaneceu desconhecido.

Neste trabalho, utilizou-se uma técnica de simpatectomia cirúrgica denominada de desnervação simpática lombar. Esse tipo de desnervação foi capaz de reduzir as concentrações de noradrenalina em 80-85% em músculos EDL, *soleus* e tibial (figura 2A, B e C, respectivamente) de ambas as patas de animais jovens e adultos, sem que houvesse alteração nas concentrações das catecolaminas plasmáticas (NAVEGANTES, 1998). A partir destas informações, tornou-se possível a investigação do papel fisiológico da inervação simpática direta na regulação da proteólise em músculos esqueléticos de ratos.

Efeito da desnervação simpática lombar na proteólise de músculos EDL de ratos alimentados e jejuados

Sabendo-se que as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) *in vitro* são capazes de reduzir a proteólise (NAVEGANTES et al., 2000), e que a simpatectomia cirúrgica induzida pela adrenodemedulação *in vivo* aumenta a degradação protéica (NAVEGANTES et al., 2001), acreditava-se que a redução nas concentrações de noradrenalina muscular promovida pela desnervação simpática lombar resultaria no aumento da proteólise total nestes animais. De forma inesperada, a proteólise total foi reduzida em músculos EDL de ratos alimentados, 3 dias após a desnervação simpática lombar (figura 7). Dados semelhantes foram também

observados apenas em músculos EDL de ratos submetidos à simpatectomia induzida pelo tratamento com guanetidina, onde se observou redução significativa da proteólise total após 2 e 4 dias de tratamento (NAVEGANTES et al., 1999). Portanto, em situações basais, a remoção aguda do componente simpático local em músculos EDL resulta em efeitos antiproteolíticos. Curiosamente, o mesmo não se observa em músculos tipicamente oxidativos como o *soleus*, pois tanto na simpatectomia induzida por guanetidina como na adrenodemedulação observa-se aumento agudo na proteólise total (NAVEGANTES et al., 1999; 2000).

Com o objetivo de avaliar se estes efeitos antiproteolíticos eram também observados em períodos mais prolongados de desnervação e em situações experimentais que sabidamente aumentam a degradação protéica (KETELHUT et al., 1994; BAVIERA et al., 2007), avaliou-se a proteólise total em músculos de ratos alimentados e jejuados durante 48 horas, 7 dias após a desnervação simpática lombar (figura 8). Observa-se que o efeito antiproteolítico induzido pela desnervação perdurou até o sétimo dia após o procedimento cirúrgico em músculos EDL de animais alimentados (figura 8A). Como esperado, o jejum aumentou a proteólise total em músculos EDL de animais *sham* e desnervados. Entretanto, o aumento da proteólise total induzida pelo jejum foi menor em músculos EDL de animais desnervados.

Com a confirmação de que a desnervação simpática lombar (após 3 e 7 dias) influenciava na degradação total de proteínas em músculos EDL de ratos, avaliou-se, em seguida, qual (s) sistema (s) proteolítico (s) era responsável pelo efeito antiproteolítico observado.

Embora não tenha sido estatisticamente significativo, observou-se uma importante tendência à redução na atividade do sistema dependente de Ub-proteassoma e na expressão da atrogina-1 em músculos EDL de ratos alimentados, 3 dias após a desnervação (figura 9A e 11A). Corroborando estes resultados, a expressão gênica da MuRF-1 foi significativamente

reduzida, sugerindo que este sistema proteolítico esteja participando dos efeitos antiproteolíticos induzidos pela desnervação (figura 11B). Em animais alimentados, a expressão gênica das duas E3-ligases, atrogina-1 e MuRF-1 (figura 11A e B, respectivamente) estão reduzidas no sétimo dia após a desnervação, embora a atividade do sistema dependente de Ub-proteassoma não esteja alterada quando avaliada *in vitro*. O aumento da atividade deste sistema induzida pelo jejum de 48 horas foi totalmente revertido em músculos EDL de ratos desnervados por 7 dias (figura 9B). Além disso, embora a atividade do sistema lisossomal avaliada *in vitro* não tenha sido alterada pela desnervação simpática lombar (figura 16), houve redução na expressão do gene que codifica a LC3, uma proteína marcadora do processo autofágico (figura 17). É importante salientar que as alterações bioquímicas e moleculares ocorridas nos músculos destes animais não podem ser atribuídas a eventuais lesões de fibras motoras do músculo por ocasião da remoção cirúrgica dos gânglios lombares, uma vez que, sabidamente, a desnervação motora (secção do nervo motor) resulta em atrofia muscular induzida pela hiperativação das E3-ligases e do proteassoma (BODINE, et al. 2001; PATTERSON, et al., 2006) De fato, nossos dados mostram que a depleção de noradrenalina não resulta em reduções das massas dos músculos, da área de secção transversa e nem mesmo em mudanças no tipo das fibras musculares, em diferentes tempos de desnervação (figura 4 e 5).

A primeira hipótese por nós aventada no sentido de esclarecer o efeito antiproteolítico induzido pela desnervação foi fundamentada no clássico efeito de regulação para cima (*up-regulation*) ou hipersensibilidade de receptores ou vias de sinalizações de um sistema frente a baixas concentrações de um hormônio e/ou neurotransmissor. Para verificar a hipótese de hipersensibilidade adrenérgica, avaliou-se inicialmente os efeitos da desnervação simpática lombar no conteúdo de AMPc, o segundo mensageiro clássico da via de sinalização das catecolaminas. Os resultados mostram que o conteúdo de AMPc foi significativamente

aumentado, 3 dias após a desnervação (figura 18A). Todo aumento na concentração de AMPc é resultante do aumento na atividade da adenilil ciclase (AC), a enzima que o produz ou da redução na atividade da fosfodiesterase, a enzima que o degrada (LYNCH & RYALL, 2008). Verificou-se no presente trabalho que o aumento na concentração de AMPc em músculos EDL de ratos foi associado à atividade aumentada da AC (figura 18B). Corroborando nossos achados, estudos prévios da literatura mostram que a simpatectomia química induzida por 6-hidroxiopamina leva ao aumento no número de receptores β -adrenérgicos em miocárdio de caninos (VALLETE et al., 1995) e na concentração do AMPc em córtex cerebral de ratos incubados com isoproterenol (SPORN et al., 1976). Além disso, no modelo de desnervação motora realizado pela secção do nervo isquiático de roedores, os níveis de AMPc e PKA estão aumentados (HOOVER et al., 2001). Vale à pena ressaltar que o nervo isquiático é composto de aproximadamente 23% de axônios simpáticos não mielinizados (SCHMALBRUCH, 1986) demonstrando, assim, que a *up-regulation* adrenérgica pode também acontecer ao nível de segundo mensageiro e suas moléculas efetoras (*downstream*) em resposta à desnervação motora. Por outro lado, Jensen et al., (2002) demonstraram que a densidade de receptores β -adrenérgicos diminui em músculos incubados na presença de elevadas concentrações de isoprenalina, um agonista β -adrenérgico não seletivo. Tais achados, em conjunto, fornecem evidências de que a depleção de noradrenalina muscular induzida pela desnervação simpática lombar causa um estado de hipersensibilidade adrenérgica em músculos EDL. Embora o presente trabalho não tenha demonstrado convincentemente que o AMPc é de fato o mediador responsável pelos efeitos inibitórios da atividade do sistema proteolítico Ub-proteassoma e da reduzida expressão dos atrogenes (atrogina-1, MuRF-1 e LC3) induzidos pela desnervação, várias evidências experimentais apontam nessa direção.

Há muito tempo se sabe que a administração sistêmica de agonistas dos recetores β_2 -adrenérgicos como formoterol, salmeterol e clenbuterol causam hipertrofia em músculos

esqueléticos de ratos, sendo esses efeitos mais evidentes em músculos glicolíticos, tais como o EDL (RYALL et al., 2006; BURNISTON et al., 2007). Curiosamente, embora esses efeitos sejam mais evidentes em músculos glicolíticos, existem trabalhos na literatura mostrando que fibras musculares predominantemente glicolíticas possuem uma densidade de receptores β_2 -adrenérgicos três vezes menor quando comparadas a fibras oxidativas (MARTIN, et al., 1989; KIM et al. 1991). Além dos efeitos hipertróficos em situações normais, tem sido demonstrado que os β_2 -agonistas têm a capacidade de prevenir a perda de massa muscular por meio da redução da ativação do sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma em modelos de desuso, tais como a suspensão da pata posterior de roedores (YIMLAMAI et al., 2005; KLINE et al., 2007) e desnervação atrofica (GONÇALVES et al., 2009; KLINE et al., 2007). Embora os efeitos anabólicos e anti-atróficos das catecolaminas e agonistas β -adrenérgicos na musculatura esquelética de animais já sejam bem conhecidos, os mecanismos intracelulares envolvidos nestas ações só agora estão sendo deslindados (MERSMANN, 1998; LYNCH & RYALL, 2008; RYALL et al., 2002; NAVEGANTES et al., 2002). O nosso laboratório tem demonstrado nos últimos anos que pelo menos parte destes efeitos adrenérgicos na musculatura esquelética de roedores são mediados pelo segundo mensageiro AMPc. De fato, a incubação de músculos isolados de ratos normais na presença de dibutilil-AMPc (DB-AMPc), um análogo sintético do AMPc, e/ou clenbuterol resulta em inibição da degradação total de proteínas (NAVEGANTES et al., 2001). Estudos mais recentes demonstram que a isobutilmetilxantina (IBMX), um inibidor não seletivo da fosfodiesterase do AMPc que promove o aumento deste nucleotídeo, é capaz de prevenir *in situ* o aumento do catabolismo protéico induzido pela sepse (LIRA et al, 2007) e inibir a hiperexpressão gênica e protéica da atrogina-1 induzida pela dexametasona em linhagens de células C2C12 (GONÇALVES et al., 2009). Estes dados indicavam que a via da sinalização do AMPc estava envolvida na supressão da expressão de genes relacionados à atrofia

muscular. Confirmando a existência deste mecanismo *in vivo*, Baviera et al. (2008) demonstraram que o tratamento com pentoxifilina, um inibidor não seletivo da fosfodiesterase do AMPc, atenuou a hiperativação do sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma e a expressão gênica da atrogina-1 em músculos de animais diabéticos. Mais recentemente, demonstrou-se também que o tratamento com clenbuterol por 4h aumentou os níveis de AMPc muscular e foi capaz de prevenir a hiperexpressão da atrogina-1 e MuRF-1 induzida pelo jejum de 2 dias (GONÇALVES et al., 2009). Com base nessas evidências, pode-se sugerir que o aumento do conteúdo de AMPc promovido pela desnervação simpática lombar resultou em inibição da expressão das E3-ligases e, conseqüentemente, na menor atividade proteolítica dependente de Ub-proteassoma em músculos EDL.

O fato da atividade lisossomal não ter sido alterada pela desnervação está de acordo com estudos anteriores de nosso laboratório. Utilizando-se dois outros modelos de simpatectomia demonstrou-se que, em animais alimentados, a atividade do sistema lisossomal em músculos esqueléticos de roedores não era afetada pela redução nas concentrações das catecolaminas plasmáticas e/ou musculares (NAVEGANTES et al., 1999; 2000). Navegantes et al. (2001) relataram que a incubação de músculos de ratos normais na presença de 10^{-5} M de clenbuterol também não altera a atividade deste sistema proteolítico avaliado *in vitro*. No que diz respeito ao processo autofágico, é importante salientar que a LC3 possui papel fisiológico importante no processo de formação do autofagossomo e tem sido utilizada como um marcador de autofagia em células musculares (ZHAO, et al., 2007) e em diversos tecidos, incluindo a musculatura esquelética de animais submetidos a situações que levam à perda de massa muscular (TANIDA et al., 2005; OGATA, et al., 2010). Entretanto, muito pouco se conhece sobre os fatores que regulam a autofagia no músculo, em situações basais e atroficas. Nossos dados indicam uma possível regulação inibitória do processo autofágico pelo AMPc, uma vez que a expressão do RNAm da LC3 foi supressa em músculos de animais

desnervados. Em concordância com esta hipótese, estudos recentes desse laboratório têm demonstrado que músculos esqueléticos de animais jejuados incubados na presença de rolipram, um inibidor seletivo da fosfodiesterase do AMPc do tipo 4, exibem uma menor expressão dos genes autofágicos, LC3 e GABARAP (LIRA, E. C. dados ainda não publicados).

As vias de sinalizações intracelulares envolvidas com a ação de diferentes hormônios, nutrientes e neurotransmissores no controle do metabolismo protéico na musculatura esquelética têm sido bastante investigadas (GLASS et al., 2003; SANDRI, 2007). Hoje, sabe-se, por exemplo, que a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), hormônios classicamente anabólicos, agem por meio da ligação com seus receptores do tipo tirosina quinase e ativam a via da fosfaditilinositol 3-quinase classe I (PI3K)/proteína quinase B (Akt). A Akt possui atividade serina/treonina quinase e é considerada uma proteína chave da sinalização intracelular no controle da massa muscular (BODINE et al., 2001; GLASS et al., 2003; SANDRI, 2007). Dessa forma, a Akt, em situações anabólicas, está fosforilada (ativa) e, sendo ela uma quinase, mantém níveis normais de fosforilação dos fatores de transcrição Foxo (*forkhead box class o*) impedindo a translocação desses fatores para o núcleo e a ativação da transcrição dos atrogênes (atrogina-1 e MuRF-1) e dos genes autofágicos (LC3 e GABARAP) (SANDRI et al., 2004). Dessa forma, acredita-se que os sistemas proteolíticos lisossomal/autofágico e dependente de Ub-proteassoma sejam regulados por uma mesma via de sinalização envolvendo Akt/Foxo (ZHAO, et al., 2007).

Embora a Akt seja uma proteína pertencente à via de sinalização clássica da insulina, tem sido demonstrado na literatura que os agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos são também capazes de ativá-la e, conseqüentemente, promover o anabolismo muscular (GONÇALVES et al., 2009; KLINE et al., 2007). Baseados no que acontece no músculo cardíaco, Kline et al. (2007) propuseram que a Akt no músculo esquelético poderia ser

fosforilada e ativada diretamente pela PI3K por meio da estimulação da subunidade $\beta\gamma$ promovida pela ligação de agonista seletivos aos receptores β_2 -adrenérgicos acoplados à proteína Gi (XIAO, 2001). Entretanto, estudos recentes de nosso laboratório demonstraram, em preparações de músculos isolados, que a Akt e Foxo podem ser diretamente fosforilados pela adrenalina e pelos análogos sintéticos do AMPc (BAVIERA et al, 2010). Muito embora o aumento nas concentrações de AMPc resulte em ações metabólicas classicamente mediadas pela PKA, recentes estudos vêm demonstrando que este nucleotídeo cíclico pode ativar uma outra proteína denominada de Epac (*Exchange protein directly activated by cAMP*) e esta, por sua vez, aumentaria os níveis de fosforilação da Akt (MEI et al., 2002; BRENNESVIK et al., 2005). A ativação desta via resulta em efeitos antiproteolíticos, uma vez que a degradação total de proteínas é inibida em músculos EDL de animais incubados na presença do 8CPT-2Me-cAMP, um agonista seletivo da Epac (BAVIERA et al., 2010).

A partir destes dados é possível sugerir que os níveis aumentados de AMPc produzidos pela maior atividade da adenil ciclase em músculos submetidos à desnervação lombar possam ativar a via de sinalização Epac/PI3K/Akt, resultando na inibição de Foxo e da expressão dos atrogenes (atrogina-1, MuRF-1 e LC3). Isto levaria, conseqüentemente, à redução na atividade proteolítica do sistema dependente de Ub-proteassoma em músculos EDL de ratos alimentados e jejuados. Para a confirmação desta hipótese, é necessário, em experimentos futuros, avaliar os níveis de fosforilação da Akt e Foxo, assim como o conteúdo da Epac, em músculos EDL de animais desnervados.

Muito embora a hipótese da hipersensibilidade adrenérgica seja bastante provável, não se pode descartar a possibilidade de que, pelo menos parte dos efeitos antiproteolíticos induzidos pela desnervação em músculos EDL tenha sido decorrente de um aumento da sensibilidade muscular à insulina. Os efeitos antiproteolíticos do hormônio insulina em músculos esqueléticos e cardíacos já estão bem estabelecidos (PRICE et al., 1996; LIU et al.,

2000). Esse efeito é mediado pela inibição do sistema dependente de Ub-proteassoma, uma vez que ratos diabéticos ou resistentes à insulina apresentam hiperativação deste sistema de degradação (WANG et al., 2006; PEPATO et al., 1996). É muito bem sabido que a ativação simpática interfere com vias de sinalizações diretamente ativadas pela insulina no controle do metabolismo de carboidratos e lipídios (HUNT & IVI, 2002). De fato, a adrenalina pode causar resistência à insulina em músculos esqueléticos de ratos *in vivo* e *in vitro* (NIKLASSON, et al., 1998; HUNT & IVY, 2002). Humanos tratados com guanetidina durante uma semana apresentam secreção de insulina diminuída após uma sobrecarga oral de glicose (KANSAL et al., 1971), o que sugere aumento da sensibilidade muscular à insulina induzido pelo bloqueio adrenérgico. Assim sendo, a redução no conteúdo de noradrenalina causada pela desnervação simpática em nosso modelo experimental poderia facilitar as ações anabólicas da insulina deste hormônio, promovendo inibição da atividade proteolítica dependente de Ub-proteassoma no músculo esquelético.

A terceira, e última hipótese, leva em consideração o fato de que o fluxo sanguíneo muscular é diretamente regulado pela inervação noradrenérgica e, portanto, pode ser alterado em resposta à desnervação simpática influenciando o metabolismo muscular. Dalessandri et al. (1988) não observaram alterações no fluxo sanguíneo muscular após a desnervação simpática. Entretanto, outros estudos em cães têm relatado que o fluxo sanguíneo muscular na pata posterior desnervada aumenta em torno de 83% quando comparada com a pata controle inervada (LEE et al., 1987). Este aumento parece estar presente na rota de fluxo não-nutritiva, onde não se observam alterações no consumo de oxigênio e no metabolismo muscular (CRONENWETT & LINDENAUER, 1977). Portanto, é possível sugerir que o fluxo sanguíneo muscular esteja aumentado em nosso modelo experimental, aumentando assim a oferta de hormônios e/ou substratos como os aminoácidos de cadeia ramificada como, por exemplo, a leucina, que potencialmente podem reduzir a degradação protéica (PEPATO et al.,

1996; NAKASHIMA et al., 2005; KADOWAKI & KANAZAWA, 2003; BAPTISTA et al., 2010).

Efeito da desnervação simpática lombar no metabolismo de proteínas em músculos soleus de ratos

Em estudos com animais simpatectomizados, demonstrou-se previamente que a depleção das catecolaminas (musculares e plasmáticas) induzida pelo tratamento com guanetidina por até 2 dias resulta no aumento transitório da atividade do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} em músculos *soleus*, mas não em EDL (NAVEGANTES et al., 1999). Uma vez que efeitos semelhantes foram observados em músculos *soleus* e EDL de animais submetidos à adrenodemedulação, concluiu-se que a adrenalina era o principal componente do simpático responsável pela inibição do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} . Dando continuidade a esses estudos, o presente trabalho apresenta evidências de que a depleção seletiva de noradrenalina muscular aumenta a atividade máxima do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} em músculos *soleus* (figura 12B), 3 dias após o procedimento cirúrgico. De forma semelhante ao modelo da simpatectomia química, este efeito também não foi observado em músculos EDL. Em conjunto, esses achados reforçam o conceito previamente estabelecido de que o SNS, por meio da secreção de adrenalina e da ativação neural direta, exerce um controle inibitório tônico do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} em músculos tipicamente oxidativos como o *soleus*. As razões para a possível inexistência desse controle em músculos glicolíticos como o EDL ainda não são conhecidas.

A atividade deste sistema proteolítico depende do aumento da sensibilidade das calpaínas ao Ca^{+2} citosólico (SAIDO et al., 1994). Para isso, é necessário um processo autoproteolítico (autólise) que remove um pequeno fragmento de ambas as subunidades das calpaínas, gerando assim uma nova forma da molécula, menor, a qual é ativa em

concentrações de Ca^{+2} próximas daquelas encontradas no citosol (GOLL et al., 1992). Interessante notar no presente trabalho que o aumento da atividade do componente proteolítico dependente de Ca^{+2} observado em músculos *soleus* desnervados foi acompanhado pelo aumento do conteúdo das μ -calpaínas, em suas formas autolisada e total (figura 13). Em diversos modelos em que se observa aumento nos níveis de Ca^{+2} intracelular, este sistema proteolítico torna-se hiperativo, contribuindo significativamente para a perda da massa muscular esquelética (SHENKMAN & NEMIROVSKAYA, 2008; TIDBALL & SPERNICER, 2000). Por exemplo, no modelo da sepse induzida pela CLP (ligadura e punção do ceco) as atividades das calpaínas apresentam-se extremamente aumentadas e correlacionadas com a diminuição na atividade da calpastatina, o inibidor endógeno dessas proteases (WEI et al., 2005). Contudo, diferentemente da sepse, o controle do sistema dependente de Ca^{+2} em nosso modelo experimental parece não envolver alterações no conteúdo da calpastatina. É possível especular que o aumento no conteúdo da μ -calpaína autolisada em músculos *soleus* desnervados seja devido ao aumento do fluxo de Ca^{+2} intracelular promovido pela perda do tônus simpático muscular. KIRCHBERGER et al. (1974) e SCHWARTZ et al. (1976) demonstraram que as proteínas responsáveis pelo transporte de Ca^{+2} para o interior do RS na musculatura esquelética são reguladas pelas catecolaminas. Verificou-se ainda que a fosforilação dessas proteínas aumenta a velocidade de seqüestro de íons Ca^{+2} do citosol para o interior do retículo (LIU et al., 1997). A partir desses achados e da constatação da presença seletiva desse sistema de transporte em músculos oxidativos como o *soleus* (WILLIAMS & BARNES, 1989), é possível inferir que, **em situações basais**, as catecolaminas estimulem os processos de captação e reserva de Ca^{+2} pelo RS, reduzindo assim as concentrações citosólicas de Ca^{+2} e, conseqüentemente, a atividade proteolítica das calpaínas.

Embora não se tenha quantificado neste trabalho o conteúdo do AMPc em músculos

soleus desnervados, uma possibilidade alternativa é que as calpaínas podem ter sido ativadas pelo aumento do fluxo intracelular de Ca^{+2} induzido pelo aumento deste nucleotídeo cíclico. De fato, tem-se demonstrado que a ativação da PKA e hiperfosforilação mediada por esta nos canais de rianodina do RS resulta na liberação de Ca^{+2} para o citosol e fadiga precoce, em situações de exercício (REIKEN et al., 2003; WARD et al., 2003). Além disso, durante o exercício físico em camundongos e humanos, esses canais de rianodina também são hiperfosforilados pela PKA, causando vazamento de Ca^{+2} para o citosol e o dano muscular observado pode estar relacionado com a ativação das calpaínas (BELLINGER et al., 2008). Portanto, se os níveis de AMPc também estiverem elevados em músculos *soleus* de animais desnervados por 3 dias, é possível sugerir que a ativação da PKA esteja levando ao vazamento de Ca^{+2} com conseqüente autólise e ativação das μ -calpaínas.

Efeito da desnervação simpática lombar no metabolismo de glicose em músculos esqueléticos de ratos

Considerando que muito pouco se conhece sobre o papel fisiológico da inervação simpática do músculo no metabolismo de carboidratos, um dos objetivos desse trabalho foi investigar os efeitos da desnervação simpática lombar no conteúdo de glicogênio, no fluxo de glicose na via de síntese do glicogênio e na oxidação de glicose.

As ações clássicas das catecolaminas no metabolismo de carboidratos e lipídios são catabólicas e mediadas pelo aumento das concentrações de AMPc e ativação da PKA, estimulando, em vários tecidos, a glicogenólise, a lipólise e a formação de lactato. Embora o conteúdo de AMPc esteja elevado, não houve alteração no conteúdo de glicogênio em músculos *soleus* e EDL de ratos desnervados por 3 dias (figura 21A). Dados semelhantes foram obtidos em ratos simpatectomizados pelo tratamento com 6-hidroxidopamina, onde também não foram observadas alterações no conteúdo de glicogênio na musculatura

esquelética desses animais (IMBACH, 1976). Apesar disso, os dados mostram que o fluxo de glicose na via de síntese de glicogênio foi aumentado em músculos EDL de animais desnervados, mas não em *soleus* (figura 21B). As causas desse efeito metabólico podem estar associadas ao aumento da captação da glicose promovido pelas altas concentrações de AMPc no músculo desnervado. Embora a adrenalina possa causar resistência à insulina em músculos esqueléticos de ratos *in vivo* e *in vitro* (NIKLASSON et al., 1998; HUNT & IVY, 2002), alguns estudos têm demonstrado que a ativação do SNS por meio da injeção de leptina no hipotálamo ventromedial leva ao aumento da captação de glicose em tecidos periféricos como no coração, no tecido adiposo marrom e no músculo esquelético. Esse efeito é abolido pelo pré-tratamento com guanetidina ou antagonistas β -adrenérgicos, mas não pela adrenalectomia (HAQUE et al., 1999; MINOKOSHI et al., 1999). Além disso, a ativação do SNS por meio da injeção central de leptina e a concomitante infusão de uma dose máxima de insulina por via intravenosa aumentam a taxa de captação de glicose para valores acima daqueles encontrados apenas pela estimulação com insulina (HAQUE et al., 1999). Esses dados, em conjunto, sugerem que o aumento na captação de glicose mediado pelo SNS ocorre principalmente pela inervação simpática direta do músculo esquelético. Múltiplas vias podem estar envolvidas na captação de glicose mediada pela ativação adrenérgica em células musculares L6: uma mediada por receptores β_2 -adrenérgicos envolvendo o AMPc e a PI3K e também uma via independente do receptor β_2 -adrenérgico e da PI3K, mas ativada por análogos de AMPc (NEVZOROVA et al., 2006). Desta forma, se o mecanismo de hipersensibilidade adrenérgica estiver realmente acontecendo em nosso modelo de simpatectomia, é possível sugerir que os níveis aumentados de AMPc ativem a via da PI3K por meio da proteína Epac (MEI et al., 2002; BRENNESVIK et al., 2005). Isto poderia levar ao aumento da captação de glicose, ao acúmulo de glicose-6-fosfato dentro da célula e à ativação consequente da enzima glicogênio sintase, explicando, dessa forma, o fluxo na via de

síntese de glicogênio aumentado em músculos EDL de ratos desnervados (figura 21B). Estes efeitos, possivelmente, não se refletem em um maior conteúdo de glicogênio, porque os altos níveis de AMPc podem também estar exercendo, via ativação da PKA, seus efeitos clássicos na ativação da glicogenólise. O aumento do AMPc poderia também explicar o aumento da taxa de oxidação observado em músculos EDL de ratos desnervados incubados na presença de insulina (figura 22A). De fato, FREERKSEN et al. demonstraram que a incubação de células musculares com agentes que elevam o conteúdo de AMPc intracelular aumenta a oxidação de glicose. Outros estudos têm demonstrado que o AMPc, via Epac, pode potencializar a fosforilação e ativação da Akt, proteína chave na via de sinalização pela qual a insulina estimula a captação de glicose na musculatura esquelética (BRENNESVIK et al., 2005). Vale à pena ressaltar que a desnervação não alterou a taxa basal de oxidação de glicose, uma condição na qual os músculos são incubados em um meio isento de insulina. Portanto, o aumento da oxidação de glicose em músculos EDL de ratos desnervados por 3 dias e incubados na presença da insulina reflete melhor as condições fisiológicas *in vivo*, onde todos os hormônios estão presentes.

Tais achados, em conjunto, sugerem que a hipersensibilidade adrenérgica induzida pela desnervação simpática lombar, através do aumento nos níveis de AMPc, esteja potencializando a via de sinalização da PI3K/Akt (via clássica da insulina) aumentando a via de síntese do glicogênio e a oxidação de glicose em músculos EDL.

6 – Conclusões

Os dados obtidos no presente estudo corroboram trabalhos anteriores de nosso laboratório demonstrando que o sistema nervoso simpático atua de forma importante controlando o metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de roedores. Desta forma, os nossos resultados sugerem que:

1. A técnica da desnervação simpática lombar é eficiente em reduzir as concentrações de noradrenalina em diversos músculos da pata posterior de ratos (jovens e adultos), o que torna este modelo de simpatectomia adequado para o estudo do papel funcional desta inervação na musculatura esquelética;
2. A desnervação simpática lombar provoca alterações distintas nos processos de degradação de proteínas e no metabolismo de carboidratos em músculos EDL (glicolíticos) e *soleus* (oxidativos), mas que não estão relacionadas com ganho ou perda de massa;
3. A redução aguda nas concentrações de noradrenalina em músculos EDL induz hipersensibilidade adrenérgica. Nessa situação, o aumento do AMPc intracelular é, provavelmente, o mecanismo responsável pela redução da atividade e expressão de componentes do sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma e da autofagia;
4. Em músculos *soleus*, a falta da ação simpática local leva à ativação máxima do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} com aumento da atividade e conteúdo da μ -calpaína, sem que haja alterações no conteúdo do inibidor endógeno deste sistema, a calpastatina;
5. A desnervação simpática lombar alterou o metabolismo de carboidratos apenas em músculos EDL. Assim, o aumento do fluxo de glicose na via de síntese de glicogênio, em situações basais, assim como no metabolismo oxidativo estimulado pela insulina,

pode também estar relacionado à hipersensibilidade adrenérgica observada nesses músculos.

7 – Referências Bibliográficas

AGATA N.; SASAI N.; INOUE –MIYAZU, M.; KAWAKAMI K.; HAYAKAWA, K.; KOBAYASHIK, K.; SOKABE, M. Repetitive stretch suppresses denervation-induced atrophy of soleus muscle in rats. **Muscle Nerve**. v. 39, n. 4, p. 456-62, 2009.

BALLARD, K. J. Typical sympathetic noradrenergic endings in a muscle spindle of the cat [proceedings] **J. Physiol**. p. 285-61, 1978.

BAPTISTA, I. L.; LEAL, M. L.; ARTIOLI, G. G.; AOKI, M. S.; FIAMONCINI, J.; TURRI, A. O.; CURI, R.; MIYABARA, E. H.; MORISCOT, A. S. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. **Muscle Nerve**. 2010. [Epub ahead of print]

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

BARON, R., W. JANIG, AND W. KOLLMANN. Sympathetic and afferent somata projecting in hindlimb nerves and the anatomical organization of the lumbar sympathetic nervous system of the rat. **J. Comp. Neurol**. v. 275, p. 460-468, 1988.

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. 104-12, 2010.

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, p. 1027-35, 2008.

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

BELLINGER, A. M.; REIKEN, S.; DURA, M.; MURPHY, P. W.; DENG, S. X.; LANDRY, D. W.; NIEMAN, D.; LEHNART, S. E.; SAMARU, M.; LACAMPAGNE, A.; MARKS, A. R. Remodeling of ryanodine receptor complex causes "leaky" channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. v. 105, p. 2198-202, 2008.

BODINE, S. C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V. K.; NUNEZ, L.; CLARKE, B. A.; POUYMIROUP, W. T.; PANARO, F. J.; NA. E.; DHARMARAJAN, K.; PAN, Z. Q.; 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, p. 1704-8, 2001.

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.

BURNISTON, J. G.; MCLEAN, L.; BEYNON, R. J.; GOLDSPINK, D. F. Anabolic effects of a non-myotoxic dose of the beta2-adrenergic receptor agonist clenbuterol on rat plantaris muscle. **Muscle Nerve**. v. 35, p. 217-23, 2007.

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.

CHALOTHORN, D.; ZHANG, H.; CLAYTON, J. A.; THOMAS, S. A.; FABER, J. E. Catecholamines augment collateral vessel growth and angiogenesis in hindlimb ischemia. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.** v. 289, p. H947 - H959, 2005.

COSTELLI, P.; REFFO, P.; PENNA, F.; AUTELLI, R.; BONELLI, G.; BACCINO, F. M. Ca(2+)-dependent proteolysis in muscle wasting. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** v. 37, p. 2134-46, 2005.

CRONENWETT, J. L., LINDENAUER, S. M. Direct measurement of arteriovenous anastomotic blood flow after lumbar sympathectomy. **Surgery.** v. 82, p. 82-9, 1977.

DALESSANDRI, K. M., LANTZ, B. M., PALMAZ, J. C. The effect of lumbar sympathectomy on postsynaptic vascular smooth muscle response in the lower limb in dogs. **Cardiovasc. Intervent. Radiol.** v. 11, p. 82-5, 1988.

DAYTON, W. R.; SCHOLLMEYER, J. V.; LEPLEY, R. A.; CORTÉZ, L. R. A calcium-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Isolation of a low-calcium-requiring form of the protease. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 659, p. 48-61, 1981.

EVANS, B. A., PAPAIOANNOU, M., BONAZZI, V. R., SUMMERS, R.J. Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat tissues. **Br. J. Pharmacol.** v. 117, p. 210-6, 1996.

FABER, J. E. In situ analysis of α -adrenoceptors on arteriolar and venular smooth muscle in rat skeletal muscle microcirculation. **Circ. Res.** v. 62, p. 36-50, 1988.

FABIO, T. L. Efeitos da hipóxia intermitente crônica no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos. Ribeirão Preto, 2009. 87 p. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

FARBER, J.L. The role of calcium in cell death. **Life Sci**, v.29, p.1289-1295, 1981.

FREERKSEN, D. L.; SCHROEDL, N. A.; JOHNSON, G. V.; HARTZELL, C. R. Increased aerobic glucose oxidation by cAMP in cultured regenerated skeletal myotubes. **Am. J. Physiol.** v. 250, p. C713-9, 1986.

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.

GARÓFALO, M.A.; KETTELHUT, I.C.; ROSELINO, J.E.; MIGLIORINI, R.H. Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v.60, n.3, p.206-208, 1996.

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

GLICKMAN, M.H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol. Rev.** v. 82, p. 373-428, 2002.

GOLL, D.E.; NETI, G.; MARES, S.W.; THOMPSON, V.F. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. **J. Anim. Sci.** v. 86, p. E19-E35, 2008.

GOLL, D. E.; THOMPSON, V. F.; TAYLOR, R. G.; ZALEWSKA, T. Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? **Bioessays.** v.14, p. 549-56, 1992.

GOMES, M. D.; LECKER, S. H.; JAGOEJ, R. T.; NAVON, A.; GOLDBERG, A. L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 98, p. 14440-5, 2001.

GONÇALVES, D. A. P. Mecanismos envolvidos na ação anabólica e anticatabólica do agonista adrenérgico β_2 no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos. Ribeirão Preto, 2009. 99 p. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

GUROFF, G. A neural, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. **Biol. Chem.** v. 239, p. 149-55, 1964.

HA, T. N. V.; POSTERINO, G. S.; FRYER, M. W. Effects of terbutaline on force and intracellular calcium in slow-twitch skeletal muscle fibres of the rat. **British Journal of Pharmacology.** v. 126, p. 1717-1724, 1999.

HAQUE, M. S.; MINOKOSHI, Y.; HAMAI, M.; IWAI, M.; HORIUCHI, M.; SHIMAZU, T. Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. **Diabetes.** v.48, p. 1706-12, 1999.

HOOVER, F.; MATHIESEN, I.; SKALHEGG, B.S.; LOMO, T.; TASKEN, K. Differential expression and regulation of the PKA signalling pathway in fast and slow skeletal muscle. **Anat. Embryol.** v. 203, n. 3, p. 193-201, 2001.

HUNT, D. G.; IVY, J. L. Epinephrine inhibits insulin-stimulated muscle glucose transport. **J. Appl. Physiol.** v. 93, n. 5, p. 1638-43, 2002.

INOMATA, M.; HAYASHI, M.; NAKAMURA, M.; IMAHORI, K.; KAWASHIMA, S. Purification and characterization of a calcium-activated neutral protease from rabbit skeletal muscle which requires calcium ions of microM order concentration. **J. Biochem.** v. 93, n. 1, p. 291-4, 1983.

JACKMAN, R.W.; KANDARIAN, S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** v. 287, p. C834-843, 2004.

JEFFERSON, L.S.; LI, J.B.; RANNELS, S.R. Regulation by insulin of amino acid release and protein turnover in the perfused rat hemi-corpus. **J. Biol. Chem.** v.252, p.1476-1483, 1977.

JENSEN, J.; BRENNESVIK, E. O.; BERGERSEN, H.; OSELAND, H.; JEBENS, E.; BRØRS, O. Quantitative determination of cell surface beta-adrenoceptors in different rat skeletal muscles. v. 444, p. 213-9, 2002.

JENSEN, J.; BRORS, O.; DAHL, H. A. Different β -adrenergic receptor density in different

rat skeletal muscle fiber types. **Pharmacol. Toxicol.** v. 76, p. 380-385, 1994.

JENSEN, J.; LAI, Y. C. Regulation of muscle glycogen synthase phosphorylation and kinetic properties by insulin, exercise, adrenaline and role in insulin resistance. **Arch. Physiol. Biochem.** v. 115, n. 1, p. 13-21, 2009.

KADOWAKI, M.; KANAZAWA, T. Amino acids as regulators of proteolysis. **J. Nutr.** v.133, n. 6-S1, p. 2052S-2056S, 2003.

KANSAL, P. C.; BUSE, J.; DURLING, F. C.; BUSE, M. G. Effect of guanethidine and reserpine on glucose tolerance. **Curr. Ther. Res. Clin. Exp.** v.13, n. 8, p. 517-22, 1971.

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.

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 Sao 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. 751-772, 1988.

KIM, Y. S., AND SAINZ, R. D. β -adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. **Life Sci.** v. 50, p. 397-407, 1991.

KIM, Y.S.; SAINZ, R.D.; MOLENAAR, P.; SUMMERS, R.J. Characterization of β_1 and β_2 -adrenoceptors in rat skeletal muscles. **Biochem. Pharmacol.** v.42, n.9, p.1783-1789, 1991.

KIRCHBERGER, M. A.; TADA, M.; KATZ, A. M. Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 6166-6173, 1974.

KINBARA, K.; ISHIURA, S.; TOMIOKA, S.; SORIMACHI, H.; JEONG, S.Y.; AMANO, S.; KAWASAKI, H.; KOLMERER, B.; KIMURA, S.; LABEIT, S.; SUZUKI, K. Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis. **Biochem. J.** v.335, n. 3, p. 589-596, 1998.

LANDSBERG, L.; YOUNG, J.B. Catecholamines and the adrenal medulla. In: Wilson JD, Foster DW (Editors), **Williams textbook of endocrinology.** 8th edn. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p 621-705.

LEE, B. Y., OSTRANDER, L. E., THODEN, W. R., MADDEN, J. L. Effect of lumbar sympathectomy on muscle blood flow: distribution of perfusion measured by hydrogen clearance in skeletal muscle. **J. Rehabil. Res. Dev.** v. 24, p. 1-8, 1987.

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

- LIU, Y.; KRANIAS, E. G.; SCHNEIDER, M. F. Regulation of Ca²⁺ handling by phosphorylation status in mouse fast- and slow-twitch skeletal muscle fibers. **Am. J. Physiol.** v. 273, p. C1915-24, 1997.
- LIU, Z.; LONG, W.; FRYBURG, D. A.; BARRETT, E. J. The regulation of body and skeletal muscle protein metabolism by hormones and amino acids. **J. Nutr.**, v. 136, p. 212S-7S, 2006.
- LIU, Z.; MIERS, W. R.; WEI, L.; BARRETT, E. J. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in heart vs skeletal muscle: effects of acute diabetes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 276, n. 3, p. 1255-60, 2000.
- LYNCH, G.S.; RYALL, J.G. Role of β -adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. **Physiol. Rev.** v. 88, p. 729-767, 2008.
- MARSHALL, J. M. The influence of the sympathetic nervous system on individual vessels of the microcirculation of skeletal muscle of the rat. **J. Physiol.** v. 332, p. 169-186, 1982.
- MARTIN, W. H.; MURPHREE, S. S.; SAFFITZ, J. E. Beta-adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red, and intermediate skeletal muscle. **Circ. Res.** v. 64, n. 6, p. 1096-105, 1989.
- MASIERO, E.; AGATEA, L.; MAMMUCARI, C.; BLAAUW, B.; LORO, E.; KOMATSU, M.; METZGER, D.; REGGIANI, C.; SCHIAFFINO, S.; SANDRI, M. Autophagy is required to maintain muscle mass. **Cell Metab.** v. 10, n. 6, p. 507-15, 2009.
- 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, n. 13, p.11497-504, 2002.
- MELLGREN, R. L. Canine cardiac calcium-dependent proteases: Resolution of two forms with different requirements for calcium. **FEBS Lett.** v. 109, n. 1, p. 129-33, 1980.
- MELLONI, E.; SALAMINO, F.; SPARATORE, B. The calpain-calpastatin system in mammalian cells: properties and possible functions. **Biochimie.** v. 74, p. 217-223, 1992.
- MELLONI, E.; MICHETTI, M.; SALAMINO, F.; MINAFRA, R.; PONTREMOLI, S. Modulation of the calpain autoproteolysis by calpastatin and phospholipids. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 229, p. 193-197, 1996.
- MERSMANN, H. J. Overview of the effects of β -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. **J. Anim. Sci.** v. 76, p. 160-172, 1998.
- MIAO, F. J.; KINNMAN, E.; JANIG, W.; LEVINE, J. D. Variation in the anatomy of the lumbar sympathetic chain in the rat. **J. Auton. Nerv. Syst.** v. 56, p. 115-8, 1995.
- MINOKOSHI, Y.; HAQUE, M. S.; SHIMAZU, T. Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. **Diabetes.** v. 48, n. 2, p. 287-91, 1999.

MORTIMORE, G.E. Mechanisms of cellular protein catabolism. **Nutr. Rev.** v. 40, p. 1-12, 1982.

NAKAMURA, M.; INOMATA, M.; HAYASHI, M.; IMAHORI, K.; KAWASHIMA, S. Purification and characterization of an inhibitor of calcium-activated neutral protease from rabbit skeletal muscle: purification of 50,000-dalton inhibitor. **J. Biochem.** v. 96, n. 5, p. 1399-407, 1984.

NAKASHIMA, K.; ISHIDA A.; YAMAZAKIY M.; ABE H.. Leucine suppresses myofibrillar proteolysis by down-regulating ubiquitin-proteasome pathway in chick skeletal muscles. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 336, n.2, p. 660-6, 2005.

NAVEGANTES, L. C. C. Controle do metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de rato pelo sistema nervoso simpático. Ribeirão Preto, 1998. 192 p. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

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.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 277, 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 AMPc. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 281, p. E449-E454, 2001.

NAVEGANTES, L.C.C.; RESANO, N.M.Z.; BAVIERA, A.M.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. CL 316,243, a selective β_3 -adrenergic agonist, inhibits protein breakdown in rat skeletal muscle. **Pflugers Arch.** v. 451, p. 617-624, 2006.

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.286, p. E642-647, 2004.

NESHER, R.; KARL, I. E.; KIPNIS, D. M. Epitrochlearis muscle. II. Metabolic effects of contraction and catecholamines. **Am. J. Physiol.** v. 239, n. 6, p. E461-7, 1980.

NEVZOROVA, J.; EVANS, B. A.; BENGTSSON, T.; SUMMERS, R. J. Multiple signalling pathways involved in beta2-adrenoceptor-mediated glucose uptake in rat skeletal muscle cells. **Br. J. Pharmacol.** v. 147, n. 4, p. 446-54, 2006.

NIELSEN, J. N.; DERAIVE, W. KRISTIANSEN, S.; RALSTON, E.; PLOUQ, T; RICHTER, E. A. Glycogen synthase localization and activity in rat skeletal muscle is strongly dependent on glycogen content. **J. Physiol.** v. 531, p. 757-69, 2001.

NIKLASSON, M.; HOLMANG, A.; LONNROTH, P. Induction of rat muscle insulin resistance by epinephrine is accompanied by increased interstitial glucose and lactate concentrations. **Diabetologia**. v. 41, n. 12, p. 1467-73, 1998.

OGATA, T.; OISHI, Y.; HIGUCHI, M.; MURAOKA, I. Fasting-related autophagic response in slow- and fast-twitch skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v. 395, p. 136-140, 2010.

PATTERSON, M. F.; STEPHENSON, G. M. M.; STEPHENSON, D. G. Denervation produces different single fiber phenotypes in fast- and slow-twitch hindlimb muscles of the rat. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 291, p. C518–C528, 2006.

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. 34, p. E340-E347, 1996.

POWERS, S. K. **Fisiologia do Exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 5 th edn. Barueri. Manole. 2005, p. 136-163.

PRICE, S. R.; BAILEY, J. L.; WANG, X.; JURKOVITZ, C.; ENGLAND, B. K.; DING, X. PHILLIPS, L. S.; MITCH, W. E. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. **J. Clin. Invest.** v. 98, 1703-1708 p., 1996.

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

REIKEN, S. LACAMPAGNE, A.; ZHOU, H.; KHERANI, A.; LEHNART, S. E.; WARD, C.; HUANG, F.; GABURIAKOVA, M.; GABURIAKOVA, J.; ROSEMBLIT, N.; WARREN, M.S.; HE, K. L.; YI, G. H.; WANG, J.; BURKHOFF, D.; VASSORT, G.; MARKS, A. R. PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. **J. Cell. Biol.** v. 160, n. 6, p. 919-28, 2003.

ROATTA, S.; FARINA, D. Sympathetic actions on the skeletal muscle. **Exerc. Sport. Sci. Rev.**, v. 38, n. 1, p. 31-5, 2010.

RYALL, J.G.; GREGOREVIC, P.; PLANT, D. R.; SILENCE, M.N.; LYNCH, G.S. Beta 2-agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 283, n. 6, p. R1386-94, 2002.

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.

SAIDO, T. C.; NAGAO, S.; SHIRAMINE, M.; TSUKAGUCHI, M.; YOSHIZAWA, T.; SORIMACHI, H.; ITO, H.; TSUCHIVA, T.; KAWASHIMA, S.; SUZUKI, K. Distinct kinetics of subunit autolysis in mammalian m-calpain activation. **FEBS Lett.** v. 346, p. 263-7, 1994.

SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology**. v. 23, p. 160-170, 2007.

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

SCHMALBRUCH, H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. **Anat. Rec.**, v. 215, n. 1, p. 71-81, 1986.

SCHWARTZ, A.; ENTMAN, M. L.; KANIIE, K.; LANE, L. K.; VAN WINKLE, W.B.; BORNET, E. P. The rate of calcium uptake into sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle and skeletal muscle. Effects of cyclic AMP-dependent protein kinase and phosphorylase b kinase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 426, n. 1, p. 57-72, 1976.

SHENKMAN, B. S.; NEMIROVSKAYA, T. L. Calcium-dependent signaling mechanisms and soleus fiber remodeling under gravitational unloading. **J. Muscle Res. Cell. Motil.** v. 29, p. 221-30, 2008.

SHI H.; ZENG, C.; RICOME, A.; HANNON, K. M.; GRANT, A. L.; GERRARD D. E. Extracellular signal-regulated kinase pathway is differentially involved in beta-agonist-induced hypertrophy in slow and fast muscles. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 292, n. 5, p. C1681-9, 2007.

SJORGREN, B.; NOERDENSJOLD, T.; HOLMGEEN, H.; MOLLERSTROM, J. Beitrag zur Kenntnis der Leberhythmik (glycogen, Phosphor und calcium in der Kaninchenleber). **Pflugers Arch. Ges. Physiol.** v. 240, p. 247-436, 1938.

SPANGENBURG, E. E. Changes in muscle mass with mechanical load: possible cellular mechanisms. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.**, v. 34, n. 3, p. 328-35, 2009.

SPORN, J. R.; HARDEN, T. K.; WOLFE, B. B.; MOLINOFF, P. B. β -adrenergic receptor involvement in 6-hydroxydopamine-induced supersensitivity in rat cerebral cortex. **Science**, v. 194, p. 624-626, 1976.

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

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

TIDBALL, J.G.; SPENCER, M.J. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. **J. Physiol.** v. 545, p. 819-828, 2002.

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

VALETTE, H.; DELEUZE, P.; SYROTA, A.; DELFORGE, J.; CROUZEL, C.; FUSEAU, C.; LOISANCE, D. Canine Myocardial Beta-Adrenergic, Muscarinic Receptor Densities After Denervation: A PET Study. **J. Nucl. Med.** v. 36, p. 140-146, 1995.

WAALKES, T.P.; UDENFRIEND, S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. **J. Lab. Clin. Med.** v. 50, n. 5, p. 733-736, 1957.

WANG, X.; HU, Z.; HU, J.; DU, J.; MITCH, W. E. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. **Endocrinology**. v. 147, n. 9, p. 4160-8, 2006.

WARD, C. W.; REIKEN, S.; MARKS, A. R.; VASSORT, G.; LACAMPAGNE, A. Defects in ryanodine receptor calcium release in skeletal muscle from post-myocardial infarct rats. **FASEB J.** v. 17, n. 11, p. 1517-9, 2003.

WEI, W.; FAREED, M. U.; EVERSON, 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. R580-90, 2005.

WILLIAMS, J. H.; BARNES, W. S. The positive inotropic effect of epinephrine on skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, v. 12, p. 968-75, 1989.

WOLF, D.H.; HILT, W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1695, n. 1-3, p. 19-31, 2004.

XIAO, R.P. Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. **Sci. STKE.**, v. 2001, n. 104, p. RE15, 2001.

YIMLAMAI, T.; DODD, S.L.; BORST, S.E.; PARK, S. Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. **J. Appl. Physiol.**, v. 99, n. 1, p. 71-80, 2005.

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 proteasomal 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](#)