

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - FMRP
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

FRANCIELE PRZYGODDA

**EFEITO AGUDO DA HIPÓXIA INTERMITENTE NO METABOLISMO DE
PROTEÍNAS EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE RATOS: PAPEL DOS
GLICOCORTICÓIDES**

RIBEIRÃO PRETO-SP

2012

FRANCIELE PRZYGODDA

**Efeito agudo da hipóxia intermitente no metabolismo de
proteínas em músculos esqueléticos de ratos: Papel dos
glicocorticóides**

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-SP

2012

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

FICHA CATALÓGRAFICA

Przygodda, Franciele

Efeito agudo da hipóxia intermitente no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos: papel dos glicocorticóides. Ribeirão Preto, 2012.

85f. 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia. Orientador: Navegantes, Luiz Carlos Carvalho.

1. Hipóxia 2. Músculo esquelético. 3. Sistemas proteolíticos. 4. Síntese protéica 5. Glicocorticóides.

Dedicatória

Aos meus pais, Julinda Bevilaqua Przygodda e Antonio Nercildo Przygodda, alicerce e porto seguro. Obrigada pela confiança e apoio na realização dos meus sonhos! É por vocês que caminho firme e conquisto cada novo passo dessa longa estrada!

Ao Anderson Mioranza, pelo exemplo de determinação e companheirismo. Obrigada pela dedicação e apoio! Meus dias não seriam os mesmos sem a sua agradável companhia!

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Luiz Carlos de Carvalho Navegantes, meu orientador e pai científico. Obrigada pela oportunidade e pela confiança depositada em mim, mesmo não conhecendo minha forma de trabalhar, acreditou na minha força de vontade e me aceitou de portas abertas. Agradeço também pela excelente orientação e pelos ensinamentos, bases fundamentais para a construção da minha formação científica e profissional.

A profa. Dra. Ísis do Carmo Kettelhut, pelo exemplo de vida e dedicação à pesquisa e ao ensino. Seu sorriso contagiante de todos os dias me motiva a continuar firme nos meus objetivos, mesmo quando esses parecem estar longe de serem alcançados.

Ao prof. Dr. Renato Hélios Migliorini (*in memoriam*), pelas brilhantes pesquisas e construção das bases estruturais do Laboratório de Controle do Metabolismo.

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

A Neusa Maria Zanon, pelo auxílio técnico indispensável e incomparável, sem o qual esse trabalho não teria sido finalizado. Agradeço também pela amizade e pelas maravilhosas horas de conversas, que enriquecem meus dias com experiência e sabedoria.

A Maria Antonieta Rissato Garófalo, pela ajuda essencial nas dosagens de catecolaminas e pelas simpáticas horas de conversa.

A Elza Aparecida Filipin, pela valiosa ajuda nos experimentos e pelas horas de conversa durante o café, e é claro, pelo café saboroso!

Ao Victor Diaz Galban, pelos bem-vindos auxílios computacionais e a Lilian Zorzenon, pela agradável convivência.

A Leni G. H. Bonagamba pela imensa ajuda com os animais durante todos os experimentos de hipóxia, sempre prestativa e gentil e pelas adoráveis conversas.

A Amanda Araújo, pelo auxílio nos experimentos, simpatia e carisma.

A Flávia Aparecida Graça, por me auxiliar no ingresso ao laboratório, pela prontidão e auxílio nas diversas dúvidas experimentais e pelas divertidas conversas.

Ao Leandro Manfredi e Dawit Albiero Pinheiro Gonçalves, pela grandiosa colaboração para a realização desse trabalho, paciência e aprendizado diário. E acredite meu caro Dawit, eu aprendi que erros jamais serão banais, mesmo porque você poderá ser o próximo a repetir o erro, mesmo que esse seja a inversão dos polos da cuba do western blot!

A Silvia de Paula Gomes, Graziela Nascimento Sodré e Priscila Cassolla, pela amizade, ensinamentos e pelas boas gargalhadas.

A todos meus amigos do Laboratório de Controle do Metabolismo, pela amizade e respeito, pelo convívio harmonioso, aprendizado constante e pelas diversas colaborações: Danilo Lustrino, Wilian de Assis Silveira, Lidiany Góis, Juliano Machado, Eduardo Carvalho Lira, Danúbia Frasson, Samyra Buzelle, Rafael Rossi Valentin, Natália Lauterbach e Jonathan Carvalho.

A todos da secretaria do Departamento de Fisiologia: Elisa, Cláudia, Fernando e Andrea, pela atenção dispensada.

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

A minha amiga e irmã Giuliana Olivi, por estar sempre presente e me ouvir com muita atenção. Você é única e especial. Agradeço também ao meu querido amigo Marciel Rodrigues, que mesmo distante jamais deixou de me apoiar nas horas difíceis.

As agradáveis companhias da quinta das amigas: Fernanda Gomes Cardoso, Letícia Magalhães Arruda, Camila Sayuri Matsumoto, Natália Candido Caçador, Carla Botelho

Machado, Greyce Kelly Steinhorst, Patricia Reis, Vivian Taís, Rafaella Lemes, Aline Sardinha, Silveli Suzuki e Renata Goto, que trazem mais alegria e descontração aos meus dias. Agradeço também todas as amizades que fiz em Ribeirão Preto, pessoas que me acolheram de braços abertos e que para sempre lembrarei.

A todos meus amigos do cursão: Larissa Oliveira, Gislaine Almeida, João Zugaib e Kauê Costa, pelas horas de aprendizado e agradável companhia. Agradeço também a todos os amigos pós-graduandos dos departamentos de Fisiologia e Bioquímica.

Ao apoio financeiro da CAPES e FAPESP.

Ontem um menino que brincava me falou
Que hoje é semente do amanhã
Para não ter medo que este tempo vai passar
Não se desespere não, nem pare de sonhar
Nunca se entregue, nasça sempre com as manhãs
Deixe a luz do sol brilhar no céu do seu olhar
Fé na vida, fé no homem, fé no que virá
Nós podemos tudo
Nós podemos mais
Vamos lá fazer o que será.

(Sementes do amanhã – Gonzaguinha).

RESUMO

PRZYGODDA, F. Efeito agudo da hipóxia intermitente no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos: Papel dos glicocorticóides. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O processo adaptativo a hipóxia implica em modificações nas funções endócrinas e metabólicas. Embora seja bem estabelecido que o metabolismo de carboidratos é profundamente alterado pela hipóxia, muito pouco se sabe acerca dos efeitos *in vivo* do estresse hipóxico no metabolismo de proteínas na musculatura esquelética. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos agudos da hipóxia intermitente nos processos de síntese e degradação protéica em músculos esqueléticos de ratos e a possível participação dos glicocorticóides na resposta induzida pela hipóxia. Para isso, ratos jovens (~80g) foram expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA) por 8 horas (6% O₂ durante 40 segundos em intervalos de 9 minutos). Os resultados mostram que a HIA é uma situação catabólica que resulta no aumento da glicose e insulina plasmática, na redução do conteúdo do glicogênio hepático (97%), oxidação de glicose muscular (40%) e massa do tecido adiposo branco retroperitoneal e epididimal (30%), sem alterações na massa muscular. No metabolismo protéico, os animais hipóxicos apresentaram aumento da proteólise total em músculos *soleus* e EDL acompanhada por uma hiperativação dos sistemas proteolíticos dependente de ubiquitina (Ub)-proteassoma e dependente de cálcio, sem que houvesse alterações na síntese protéica. Essa resposta foi associada ao maior conteúdo de proteínas miofibrilares conjugadas à Ub e à ativação da expressão de genes relacionados à atrofia (atrogina-1 e MuRF1) e autofagia (LC3 e GABARAP). Adicionalmente, em músculos *soleus*, observou-se redução da fosforilação da Akt (Ser⁴⁷³), uma proteína chave no controle

do metabolismo protéico. Verificou-se ainda que a adrenalectomia em animais hipóxicos preveniu a ativação dos sistemas proteolíticos e a transcrição do RNAm dos “atrogenes” sem alterar a autofagia.

Esses dados mostram que a HIA, durante 8 horas, age como um gatilho catabólico no processo de degradação de proteínas dependente de Ub-proteassoma e cálcio assim como na hiperexpressão de genes relacionados à atrofia e autofagia. A ativação do programa atrofico induzido pela HIA parece ser mediada pelos glicocorticóides sendo esta resposta provavelmente importante para o fornecimento de aminoácidos do músculo para o fígado e manutenção da hiperglicemia. Portanto, essa resposta catabólica se sustentada pode levar à perda de massa muscular esquelética em situações de exposição prolongada à hipóxia intermitente.

ABSTRACT

PRZYGODDA, F. Acute effect of intermitente hypoxia on protein metabolismo in skeletal muscle of rats: Role os glucocorticoids. 2012. 85 p. Dissertation (Master degree) School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The adaptive process to hypoxia involves changes in endocrine and metabolic functions. Although it is well established that the carbohydrate metabolism is profoundly altered by hypoxia, the *in vivo* effects of hypoxic stress on protein metabolism in skeletal muscle is still poorly understood. Thus, the main goal of the present work was to investigate the acute effects of intermittent hypoxia on the processes of synthesis and protein degradation in rat skeletal muscles and the possible role of glucocorticoids in the responses induced by hypoxia. For this, young rats (~80g) were exposed to acute intermittent hypoxia (AIH) for 8 hours (6% O₂ for 40 seconds at 9 minutes intervals). The data show that AIH is a catabolic situation that increases plasma levels of glucose and insulin, reduces the content of liver glycogen (97%), the muscle glucose oxidation (40%) and the retroperitoneal and epididymal white adipose tissue mass (30%), without changing muscle mass. With respect to the protein metabolism, AIH rats showed an increase in the rates of overall proteolysis in *soleus* and EDL muscle, which were accompanied by a hyperactivity of the ubiquitin (Ub)-proteasome and calcium-dependent proteolytic systems, without changes in rates of protein synthesis. This response was associated with a high content of myofibrillar proteins Ub-conjugates and mRNA levels of atrophy-related genes (atrogin-1 and MuRF1) and autophagic genes (LC3 and GABARAP). Furthermore, in *soleus* muscle, we observed reduction of Akt phosphorylation (Ser⁴⁷³), a key protein in the control of protein metabolism. It was also found

that adrenalectomy prevented activation of proteolytic systems and gene transcription of “atrogenes” in hypoxic rats, while the autophagic genes were not affected.

The data suggest that the AIH, during 8 hours, acts as a catabolic trigger activating the Ub-proteasome and calcium-dependent proteolytic processes, as well as the expression of atrophy-related genes and autophagy. The activation of atrophy program induced by hypoxia seems to be mediated by glucocorticoids, and is probably important for the provision of amino acids from muscle to the liver which maintains the hyperglycemia. Therefore, this catabolic response, if sustained, can lead to the loss of skeletal muscle mass in situations of prolonged exposure to intermittent hypoxia.

LISTA DE SIGLAS

Akt	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variância
Atg	Genes relacionados à autofagia
ATP	Trifosfato de adenosina
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDL	Extensor digitorum longus
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPI	Tecido adiposo branco epididimal
EPM	Erro padrão da média
E1	Enzima ativadora de ubiquitina
E2	Enzima carreadora de ubiquitina
E3	Enzima ligante de ubiquitina
E64	Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
FI _{O2}	Fração inspirada de oxigênio
FoxO	Forkhead box class O
GABARAP	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GR	Receptor do hormônio glicocorticóide

GRE	Elemento responsivo aos glicocorticóides
GTT	Teste de tolerância à glicose
HCl	Ácido clorídrico
HIA	Hipóxia intermitente aguda
HIC	Hipóxia intermitente crônica
HIF-1	Hypoxia inducible factor
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina – I
ITT	Teste de tolerância à insulina
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
Kitt	Constante do desaparecimento da glicose
KOH	Hidróxido de potássio
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MG132	N-carboxibenzoxi-Leu-Leu-Leucinal
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MuRF1	Muscle ring finger protein 1
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NC	Nitrocelulose
N ₂	Nitrogênio
NH ₄ ⁺	Fosfato de amônio
O ₂	Oxigênio
PI3K	Fosfaditilinositol 3-quinase
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
PPO	2,5-diphenyloxazole

RETRO	Tecido adiposo branco retroperitoneal
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNS	Sistema Nervoso Simpático
S6K1	p70 ribosomal protein S6 kinase 1
Tris	(Hydroxymethyl)aminomethane
TAB	Tecido adiposo branco
TCA	Ácido tricloroacético
Ub	Ubiquitina

SUMÁRIO

1 Introdução	01
1.1 <i>Hipóxia</i>	01
1.2 <i>Controle do metabolismo muscular</i>	02
1.2.1 <i>Participação da via de sinalização PI3K/Akt no controle do metabolismo protéico</i>	08
1.3 <i>Glicocorticóides e o metabolismo muscular</i>	09
2 Objetivos.....	12
2.1 <i>Específicos</i>	12
3 Material e métodos	13
3.1 <i>Animais</i>	13
3.2 <i>Modelo experimental</i>	13
3.2.1 <i>Hipóxia intermitente aguda</i>	13
3.2.2 <i>Adrenalectomia</i>	14
3.2.3 <i>Adrenodemedulação</i>	15
3.2.4 <i>Grupos experimentais</i>	15
3.3 <i>Determinação da proteólise em músculos esqueléticos de ratos</i>	16
3.3.1 <i>Avaliação da atividade proteolítica</i>	17
3.3.2 <i>Procedimentos experimentais para a avaliação dos sistemas proteolíticos</i>	18
3.4 <i>Determinação da síntese protéica em músculos esqueléticos de ratos</i>	22
3.5 <i>Teste de tolerância à glicose (GTT)</i>	24
3.6 <i>Determinação da taxa de oxidação de glicose em músculos esqueléticos de ratos</i>	25
3.7 <i>Avaliação da Expressão Gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)</i>	26
3.8. <i>Quantificação do conteúdo protéico dos componentes dos sistemas de degradação de proteínas, caspase-3 e da via de sinalização da Akt em músculo esquelético de ratos</i>	29
3.8.1 <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)</i>	29
3.8.2 <i>Western blot</i>	30
3.9 <i>Determinação do glicogênio hepático e muscular</i>	31
3.10 <i>Concentração de catecolaminas plasmáticas e teciduais</i>	32

3.11 Análises bioquímicas	32
3.12 Análise estatística	32
4 Resultados	34
4.1 Caracterização do modelo experimental.....	34
4.2 Efeito da HIA na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina.....	37
4.3 Efeito da HIA no metabolismo de proteínas em músculos isolados de ratos.....	39
4.3.1 Velocidade de síntese e degradação de proteínas musculares	39
4.3.2 Atividades dos sistemas proteolíticos em músculos esqueléticos.....	41
4.4 Efeito da HIA na expressão dos atrogenes.....	45
4.5 Efeito da HIA no conteúdo protéico dos componentes dos sistemas de degradação de proteínas e caspase-3.....	50
4.6 Efeito da HIA na oxidação de glicose em músculos esqueléticos	54
4.7 Efeito da HIA na fosforilação da Akt no músculo esquelético	55
5 Discussão	57
6 Conclusões	71
7 Referências bibliográficas.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipóxia

O oxigênio (O_2) é essencial à manutenção da vida. Todas as células, em particular as eucarióticas, dependem para a sua sobrevivência de um adequado fornecimento de O_2 . Isto porque, em longo prazo, o O_2 é o aceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial que permite o processo de fosforilação oxidativa e a geração de energia celular, na forma de trifosfato de adenosina (ATP) (LÓPEZ-BARNEO et al., 2001).

A hipóxia tecidual ocorre quando o suprimento de O_2 para os tecidos é incapaz de manter a demanda celular, havendo comprometimento das funções biológicas. É encontrada em diversas situações fisiológicas e patológicas como a exposição a altas altitudes, exercício muscular, anemia, inflamação, infarto do miocárdio ou sistema nervoso central, tumores sólidos (HOCKEL; VAUPEL, 2001) e desordens respiratórias do sono (PRABHAKAR; KUMAR, 2004). A falta de O_2 crônica causa danos irreversíveis nas células (LÓPEZ-BARNEO et al., 2001) e diminui a qualidade de vida do indivíduo, aumentando a incidência de hipertensão, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (NIETO et al., 2000; SHAHAR et al., 2001).

O processo adaptativo à hipóxia implica em modificações nas funções endócrinas e metabólicas (MICHIELS, 2004). Muitos estudos têm demonstrado que a hipóxia induz mudanças na homeostase da glicose, porém os efeitos *in vivo* do estresse hipóxico no metabolismo de proteínas, e mais particularmente nos processos de degradação, ainda não são conhecidos (PALMA et al., 2006). Sabe-se que o metabolismo muscular também é profundamente alterado pela hipóxia uma vez que a atrofia da musculatura esquelética é uma manifestação clínica comum em condições hipoxêmicas (HOPPELER et al., 1990;

DEBIGARE et al., 2001). Estudos clássicos mostram que a hipóxia e/ou anóxia inibe a síntese protéica em diafragmas isolados de ratos (MANCHESTER; YOUNG, 1959) e aumenta a degradação de proteínas em células (PETTERSEN et al., 1986). Outros estudos demonstraram que a hipóxia aguda inibe a síntese protéica em músculos gastrocnêmios de ratos, sendo a fração de proteínas miofibrilares a mais comprometida (PREEDY; SUGDEN, 1989). No entanto, os mecanismos intracelulares responsáveis pela perda de massa muscular nessas condições ainda não foram totalmente elucidados.

Nosso laboratório mostrou pela primeira vez os efeitos *in vivo* da hipóxia intermitente crônica (HIC) no metabolismo de proteínas musculares. Ratos jovens submetidos à HIC por 9 dias exibiram taxas reduzidas de síntese protéica, sugerindo que esse é o principal mecanismo associado com a redução da massa muscular. Além disso, observou-se que a HIC reduziu a proteólise dependente de cálcio por aumentar a expressão protéica de calpastatina, um inibidor endógeno das calpaínas, as enzimas chaves desse processo proteolítico. Este efeito antiproteolítico foi interpretado como uma resposta adaptativa do organismo, muito provavelmente mediada pelo Sistema Nervoso Simpático (SNS), no sentido de prevenir a perda excessiva da massa muscular esquelética resultante da reduzida síntese protéica (FÁBIO, 2009). Contudo, permanecem desconhecidos os efeitos catabólicos no metabolismo protéico muscular decorrentes da exposição aguda do animal à hipóxia intermitente que orquestram a série de processos metabólicos de defesas intracelulares, que tornam o indivíduo mais tolerante à baixa tensão de O₂ mais prolongada.

1.2 Controle do metabolismo muscular

O tecido muscular desempenha importantes funções na geração de força para locomoção e sustentação corporal. Além disso, possui um papel crucial na homeostase do

metabolismo corporal durante estados de demanda energética (ex: inadequada ingestão calórica ou condições patológicas), fornecendo aminoácidos para diversos processos metabólicos como, por exemplo, a gliconeogênese hepática, a síntese de novas proteínas e a produção de energia (KETTELHUT et al., 1988; GOODMAN et al., 2011).

O músculo esquelético compreende 40 a 50% da massa corporal total (LEE et al., 2000). A manutenção dessa massa muscular resulta do balanço dinâmico entre síntese e degradação protéica. Esses dois processos são modulados por fatores neurais, hormonais, nutricionais e mecânicos que alteram o *turnover* de proteínas e promovem variações fenotípicas na musculatura esquelética (MITCH; GOLDBERG, 1996; NAVEGANTES et al., 2002; SANDRI et al., 2004).

Os processos de síntese e degradação protéica são precisamente regulados, sendo que um pequeno decréscimo da síntese ou uma pequena aceleração da degradação, se sustentada, resulta em uma marcada perda de massa muscular esquelética (LECKER et al., 2006). O processo de degradação protéica e os mecanismos moleculares envolvidos no controle dos sistemas proteolíticos intracelulares que levam a essa redução da massa muscular esquelética ainda são pouco compreendidos.

O músculo esquelético contém três principais sistemas proteolíticos responsáveis pela degradação protéica: (1) o lisossomal cujas proteases, enzimas responsáveis pela degradação das proteínas, são diferentes isoformas das catepsinas; (2) o sistema proteolítico dependente de cálcio que contém duas principais proteases, a microcalpaína e a milicalpaína, e seu inibidor endógeno, a calpastatina e; (3) um sistema que é considerado de vital importância denominado de ubiquitina (Ub)-proteassoma dependente de ATP (GOLL et al., 2008).

O *sistema lisossomal* representa uma das principais vias proteolíticas em células de mamíferos e participa da degradação de vários componentes celulares nas mais variadas condições fisiológicas (ex: jejum) e patológicas (ex: sepse) (WING; GOLDBERG, 1993). O

lisossomo constitui o sítio de degradação desse sistema e pode ser definido como uma vesícula envolta por uma membrana bilaminada, contendo altas concentrações de vários tipos de hidrolases ácidas, dentre elas as proteases, glicosidases, lipases, nucleases e fosfatases. O requerimento de um meio ácido para a ativação dessas enzimas confere uma proteção adicional ao interior celular contra a autodigestão disseminada, uma vez que somente o lúmen intralisossomal possui o pH adequado (pH 4–5) (BECHET et al., 2005).

O lisossomo funciona como uma organela de reciclagem que fragmenta moléculas complexas trazidas para a célula por endocitose. Após a fragmentação das moléculas em componentes mais simples (ex: aminoácidos, monossacarídeos e ácidos graxos), esses fragmentos são liberados no citosol para serem reciclados em novos componentes celulares ou metabolizados (LEHNINGER et al., 2002).

As catepsinas L, B, D e H são as proteases mais importantes e determinam a capacidade proteolítica do lisossomo (BECHET et al., 2005). Essas enzimas são responsáveis por degradar grande parte das proteínas extracelulares e de membrana endocitadas bem como proteínas citoplasmáticas e organelas (TANIDA et al., 2004). 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 macroautofagia possui como característica principal a formação de uma vesícula com membrana dupla, o autofagossomo, que se funde com o lisossomo formando o autolisossomo. É ativada em períodos iniciais do jejum no fígado e no músculo esquelético, sendo responsável pela degradação de proteínas dispersas em grandes porções no citosol e até mesmo organelas (KLIONSKY; EMR, 2000; MIZUSHIMA et al., 2004). Os genes relacionados à autofagia (Atgs), inicialmente identificados em leveduras (OHSUMI, 2001),

estão amplamente distribuídos em diferentes tecidos humanos e animais, incluindo o músculo esquelético (MIZUSHIMA et al., 2004; YAN et al., 2005). Os genes autofágicos, LC3 (do inglês, *microtubule-associated protein light chain 3*) e GABARAP (do inglês, *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*) exercem papel fisiológico importante no processo de formação do autofagossomo e tem sido utilizados como marcadores importantes de autofagia na musculatura esquelética em diferentes condições que levam à perda de massa, como o jejum e a desnervação (MIZUSHIMA et al., 2004; TANIDA et al., 2004; OGATA et al., 2010). Entretanto, não se conhece se o estado hipóxico pode resultar em alteração desse processo na musculatura esquelética.

O sistema proteolítico dependente de cálcio baseia-se na atividade de cisteínas proteases ativadas por cálcio conhecidas por calpaínas. Existem três principais isoformas de calpains: calpaína 1, 2 e 3, sendo a última, específica da musculatura esquelética e também denominada de p94 (KINBARA et al., 1998). As 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 cálcio compreendidas entre 5-50 e 200-1000 μ M, respectivamente (INOMATA et al., 1983). As duas isoformas são estruturalmente semelhantes. São heterodímeros com peso molecular de 110 kDa constituídos por uma subunidade de 80 kDa, responsável pela atividade proteolítica e ligação ao cálcio, e outra de 30 kDa, que parece estar relacionada com associação da enzima à membrana plasmática, assim como com a modulação de sua atividade catalítica (MELLONI et al., 1992). Curiosamente, estas proteases são as únicas que se conhecem por ter um inibidor endógeno, a calpastatina (TIDBALL; SPENCER, 2000). A importância fisiológica desta inibição ainda permanece um mistério científico.

Esse sistema proteolítico regula diversas funções intracelulares, entre elas a proliferação, diferenciação, migração e a morte apoptótica (CARAFOLI; MOLINARI, 1998;

NIXON, 2003; SUZUKI et al., 2004). É bem conhecido que este sistema está hiperativado em modelos experimentais, onde se observa que o catabolismo protéico está geralmente associado ao aumento nos níveis intracelulares de cálcio. Como exemplo, pode-se citar a sepse (WEI et al., 2005), a caquexia associada ao câncer (BOSSOLA et al., 2008) e a hipóxia (FAGAN et al., 1992). De fato, está muito bem estabelecido que a baixa tensão de O₂ resulta no aumento do fluxo de cálcio intracelular e na ativação das calpaínas em músculos esqueléticos *in vitro* (FAGAN et al., 1992). No entanto, isto nunca foi demonstrado em um modelo experimental de hipóxia *in vivo*.

Estudos com animais transgênicos mostram que a hiperexpressão de calpastatina resulta em hipertrofia muscular, o que indica que o sistema proteolítico dependente de cálcio também é importante para a manutenção normal da massa muscular esquelética (TIDBALL; SPENCER, 2000). De acordo com esta hipótese, há uma interação funcional entre os sistemas proteolíticos dependente de cálcio e Ub-proteassoma no controle do *turnover* das proteínas miofibrilares (JACKMAN; KANDARIAN, 2004). Primeiramente, as calpaínas estariam envolvidas na clivagem de proteínas sarcoméricas localizadas principalmente na linha Z, liberando os filamentos finos (actina) e miosina (grossos) miosina das miofibrilas no citosol. Uma vez liberadas dos sarcomêros, as proteínas miofibrilares poderiam ser degradadas pelo proteassoma, que é incapaz de degradar proteínas miofibrilares intactas, dispostas na estrutura do sarcômero (GOLL et al., 2008).

O *sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma* representa a via mais importante de degradação de proteínas no músculo e em diferentes tecidos. Esse sistema é responsável pela degradação das proteínas anormais, fornecimento de aminoácidos para neoglicogênese, apresentação de antígenos na geração da resposta imune e modulação de processos celulares através da remoção rápida de proteínas regulatórias (ex; fatores de transcrição e enzimas) essenciais para o controle do crescimento celular e metabolismo

(LECKER et al., 2006). Além dessas suas funções normais no interior das células, a ativação desse processo proteolítico é o principal mecanismo fisiopatológico responsável pela perda de massa muscular que ocorre em diferentes situações catabólicas como o jejum (KETTELHUT et al., 1994), o desuso (BEEHLER et al., 2006), a insuficiência renal crônica (BAILEY et al., 1996), diabetes mellitus (WING, 2008) e a caquexia associada ao câncer (RUSSEL et al., 2009).

A degradação de proteínas intracelulares realizadas pelo sistema ubiquitina-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 ubiquitina 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 (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002).

A conjugação da ubiquitina aos seus substratos protéicos requer a participação sincronizada das enzimas E1 (enzima ativadora de ubiquitina), E2 (enzima carreadora de ubiquitina) e E3 (enzima ligante de ubiquitina). Dentre essas enzimas, as E3-ligases apresentam maior relevância, pois são elas as responsáveis pela seleção das proteínas que receberão a cadeia de poli-ubiquitina, conferindo especificidade a este sistema proteolítico (LECKER et al., 2006). Entre os diferentes tipos de E3 conhecidas, as mais estudadas são a MuRF1 (do inglês, *muscle ring finger protein 1*) e a atrogina-1, também chamada de MAFbx (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001). Essas proteínas são expressas exclusivamente no músculo esquelético e cardíaco e estão envolvidas em uma série de modificações transcricionais que participam de um “programa atrófico” que precede a degradação de proteínas musculares pelo proteassoma. Dá-se o nome de atrogenes ao conjunto de genes que fazem parte deste programa, ou seja, que são hiperexpressos ou suprimidos em resposta à

atrofia muscular, independentemente de sua causa. Entre aqueles que são ativados pode-se citar as Ub ligases, a Ub, a E2, a catepsina L e os genes autofágicos LC3 e GABARAP. Entre os que são supressos estão os genes relacionados com a fosforilação oxidativa ou síntese de ATP e o metabolismo da glicose (LECKER et al., 2004 ; KRAWIEC et al., 2005). A inibição da síntese de ATP durante a condição atrofica parece ser um mecanismo de compensação metabólica importante no sentido de reduzir o trabalho celular (LECKER et al., 2004) e com isso preservar ao máximo a massa protéica muscular.

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).

1.2.1 Participação da via de sinalização PI3K/Akt no controle do metabolismo protéico

A via de sinalização *PI3K/Akt* exerce um papel central no controle da síntese e degradação protéica no músculo esquelético (GLASS et al., 2003; HOFFMAN; NADER, 2004; SANDRI et al., 2004). Quando fosforilada por hormônios anabólicos como a insulina ou o IGF-1, a Akt torna-se ativa e dessa forma pode controlar, em paralelo, o anabolismo e o catabolismo protéico muscular. Por duas vias distintas, a Akt fosforilada estimula a via da

mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*) elevando assim as taxas de síntese protéica e inibe a degradação protéica dependente de Ub-proteassoma via redução da atividade transcricional de FoxO (1 e 3) (do inglês, *forkhead box class O*) (ZHAO et al., 2007). Por outro lado, na ausência de hormônios anabólicos como, por exemplo, no jejum e no diabetes, onde os níveis insulinêmicos estão reduzidos, a fosforilação da Akt torna-se reduzida e o resultado é um aumento da degradação com redução da síntese protéica. Nessas situações, FoxO desfosforilado permanece ativo no núcleo estimulando a transcrição dos atrogenes (SANDRI et al., 2004) e a ativação do sistema proteolítico Ub-proteassoma. Diferentes estudos têm demonstrado que a ativação de FoxO3 induz a expressão de múltiplos atrogenes e causa dramática atrofia em culturas de miotúbulos (SANDRI et al., 2004) e em músculos de camundongos (JAGOE; GOLDBERG, 2001) e ratos (CHO et al., 2010).

1.3 Glicocorticóides e o metabolismo muscular

Os glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) pertencem à família dos hormônios esteróides, que tem como precursor o colesterol. São sintetizados na zona fasciculada do córtex da adrenal (AIRES et al., 2008) e a sua secreção está sob o controle do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é secretado pela hipófise anterior em resposta à liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) por neurônios hipotalâmicos (LIGHTMAN; CONWAY-CAMPBELL, 2010). Os níveis dos glicocorticóides obedecem a um padrão de ritmo circadiano endógeno (WINDLE et al., 1998; YOUNG et al., 2004), sendo regulado também em resposta a estressores agudos e crônicos (AIRES et al., 2008).

Sabe-se que muitas condições patológicas caracterizadas pela atrofia muscular estão associadas ao aumento dos níveis circulantes de glicocorticóides (LECKER et al., 1999;

SCHAKMAN et al., 2008). A adrenalectomia ou a administração do esteróide antagonista do receptor de glicocorticóide (RU-486) atenua essa condição em diversos modelos experimentais (WING et al., 1993); PRICE et al., 1994; SCHAKMAN et al., 2008). Por outro lado, já é bem estabelecido na literatura que altas doses de glicocorticóides sintéticos, como por exemplo a dexametasona, aumentam a taxa de degradação de proteínas no músculo esquelético (COMBARET et al., 2004), o que confirma a ação atrofica do hormônio.

A atrofia muscular induzida pelo glicocorticóides resulta do decréscimo da taxa de síntese e/ou aumento da degradação protéica (GOLDBERG et al., 1980; LOFBERG et al., 2002). O efeito inibitório da síntese protéica é resultado de diferentes mecanismos. Além de inibir o transporte de aminoácidos para os músculos (SCHAKMAN et al., 2008), sabe-se que os glicocorticóides também inibem a mTOR, a proteína quinase responsável pela fosforilação de 4E-BP1 e S6K1, dois fatores de iniciação da tradução, importantes na maquinaria de síntese protéica (LIU et al., 2001, 2004). Outras evidências indicam que os glicocorticóides causam atrofia muscular por inibir a miogênese através da *downregulação* de miogenina, um fator de transcrição obrigatório na diferenciação de células satélites em fibras musculares (Te PAS et al., 2000).

O efeito estimulatório dos glicocorticóides na proteólise muscular é caracterizado pela atrofia das fibras de contração rápida ou fibras musculares do tipo II. A degradação de proteínas resulta, principalmente, da ativação do sistema Ub-proteassoma. Entretanto, experimentos utilizando bloqueadores seletivos dos diferentes processos proteolíticos mostraram que os glicocorticóides também são capazes de estimular a proteólise lisossomal e a dependente de cálcio (HASSELGREN, 1999) em situações como a sepse, por exemplo.

A ativação do sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma pelos glicocorticóides resulta de sua ação estimulatória na transcrição de genes atroficos, como a atrogina-1 e MuRF1, as duas Ub ligases envolvidas no direcionamento das proteínas a serem

degradadas pela maquinaria do proteassoma no músculo esquelético (SCHAKMAN et al., 2008). Diversos estudos têm demonstrado que os glicocorticóides alteram a transcrição dos atrogenes por diferentes mecanismos: 1) Redução da fosforilação da Akt resultando na ativação de FoxO (LONG et al., 2003; SANDRI et al., 2004); 2) Ligação direta do glicocorticóide e seu receptor (GR) em sequências específicas de DNA (GRE: elemento responsivo aos glicocorticóides) nos promotores dos atrogenes; 3) Ativação sinérgica do promotor dos atrogenes (ex: MuRF1) por FoxO1 e GR (WADDELL et al., 2008).

Tendo em vista que a hipóxia é um importante estímulo para ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (YOKOE et al., 2008) e experimentos anteriores de nosso laboratório que mostram que ratos jovens submetidos à HIC por 9 dias exibem menor velocidade de crescimento corporal e baixos valores de síntese protéica associados à perda de massa muscular esquelética, nossa **hipótese** é que os efeitos agudos da hipóxia intermitente possam resultar em ativação do sistema Ub-proteassoma, sendo essa resposta catabólica mediada pelos glicocorticóides.

2 OBJETIVOS

Investigar os efeitos agudos da hipóxia intermitente no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos.

2.1 Objetivos específicos

Utilizando músculos esqueléticos oxidativos (*soleus*) e glicolíticos (EDL; *extensor digitorum longus*) de animais submetidos à hipóxia intermitente aguda (8 horas) pretendeu-se:

1. Determinar o perfil metabólico e hormonal e a tolerância à glicose;
2. Quantificar a proteólise total e a velocidade de síntese protéica *in vitro*;
3. Investigar as atividades das diferentes vias proteolíticas dependente de Ub-proteassoma, lisossomal e dependente de cálcio *in vitro*;
4. Determinar a expressão gênica das Ub-ligases (atrogina-1 e MuRF1) e dos marcadores do processo autofágico (LC3, GABARAP e BECLIN);
5. Avaliar a participação do hormônio glicocorticóide na alteração da expressão gênica e ativação dos sistemas proteolíticos induzida pela hipóxia;
6. Quantificar o conteúdo protéico dos conjugados de ubiquitina das calpaínas (m-calpaína e μ -calpaína) e da caspase-3;
7. Avaliar a oxidação de glicose na presença ou não de insulina;
8. Verificar a participação da Akt na via de sinalização envolvida na resposta induzida pela hipóxia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar com massa corporal entre 75-85g e um grupo de 50-55g (apenas para os procedimentos cirúrgicos de adrenalectomia e adrenodemedulação), provenientes do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo da USP de Ribeirão Preto (PCARP). A utilização de animais jovens neste trabalho é exclusivamente devido às limitações do procedimento experimental que utilizamos para avaliar o metabolismo protéico em músculos isolados (ver item 3.3). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia, recebendo dieta balanceada (NUVLAB CR1 - NUVITAL) para roedores e água *ad libitum* em ambiente com ciclos luz-escuro de 12 horas (luzes acesas às 6:00 horas e apagadas às 18:00 horas) e temperatura controlada para 25°C. Todos os animais permaneceram nestas condições ambientais por pelo menos 24 horas antes de qualquer procedimento experimental.

Os experimentos foram realizados às 17:30 horas, imediatamente após o término de apenas 1 ciclo de hipóxia/normóxia. O sacrifício dos animais foi realizado por deslocamento cervical ou decapitação (para a coleta de sangue).

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

3.2 Modelo experimental

3.2.1 Hipóxia intermitente aguda

Para a hipóxia intermitente aguda (HIA), os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: o grupo hipóxico e o grupo controle. Os animais do grupo controle foram mantidos sobre condições normóxicas em câmaras similares às aquelas usadas pelos animais do grupo hipóxico. Os ratos foram colocados em gaiolas (máximo de 7 animais por gaiola) e mantidos dentro de câmaras Plexiglass (volume 210 l) equipadas com injetores de gás assim como sensores para O₂, CO₂, umidade e temperatura.

O protocolo de hipóxia consistiu em 5 minutos de normóxia (concentração do oxigênio inspirado - FI_{O₂} - de 20,8%) seguidos de 4 minutos de injeção de N₂ (100%) dentro da câmara para reduzir a FI_{O₂} de 20,8 para 6% (o que leva cerca de 200 segundos), permanecendo neste nível durante 40 segundos. Após este período de hipóxia, O₂ (100%) foi injetado para retornar a FI_{O₂} para seu patamar original de 20,8%. Este ciclo de 9 minutos se repetiu ao longo de 8 horas. As injeções de N₂ e O₂ foram reguladas por um sistema de válvula solenóide, sendo a abertura e fechamento de cada um dos ejetores controlados por um sistema computadorizado (Oxycycler, Biospherix, Redfield, NY, USA). Em outras câmaras, na mesma sala, o grupo controle foi exposto a FI_{O₂} de 20,8%, durante 8 horas. O ciclo iniciou às 9:30 horas e finalizou às 17:30 horas. Os animais foram sacrificados logo após o término do ciclo. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Benedito Honório Machado.

3.2.2 Adrenalectomia

Para o estudo do papel dos glicocorticóides no controle do balanço protéico, os animais foram submetidos à adrenalectomia com peso inicial em torno de 55g, 7 dias antes do protocolo de hipóxia. O grupo adrenalectomizado foi anestesiado com a mistura de cloridrato

de Xilazina e Ketamina (85 mg/kg e 10 mg/kg de massa corporal de rato, respectivamente; i.p.), e duas incisões foram feitas paralelas à coluna vertebral imediatamente abaixo da última costela. As glândulas adrenais depois de visualizadas foram pinçadas pela gordura peri-renal e retiradas completamente. O grupo controle (cirurgia-fictícia) sofreu o mesmo procedimento, exceto a remoção das glândulas adrenais. Após a cirurgia, os animais foram colocados em suas caixas, tendo livre acesso à água e comida, sendo que para o grupo de animais que sofreram a retirada das glândulas adrenais, a água foi substituída por solução fisiológica (NaCl 1%), com o intuito de manter a concentração fisiológica de sódio no plasma.

3.2.3 Adrenodemedulação

Um grupo de animais com peso aproximado de 50g foi submetido à adrenodemedulação, 10 dias antes do protocolo de hipóxia. Os animais foram anestesiados com a mistura de cloridrato de Xilazina e Ketamina (85 mg/kg e 10 mg/kg de massa corporal de rato, respectivamente; i.p.), e duas incisões foram feitas paralelas à coluna vertebral imediatamente abaixo da última costela. As glândulas adrenais depois de visualizadas foram pinçadas pela gordura peri-renal e cortadas na extremidade superior (córtex) com o auxílio de uma pequena lâmina. Em seguida, a glândula foi suavemente pressionada para retirada somente da medula adrenal. O grupo controle (cirurgia-fictícia) sofreu o mesmo procedimento, exceto a remoção da medula adrenal.

3.2.4 Grupos experimentais

Para a grande maioria dos experimentos foram utilizados dois grupos de animais divididos em:

- a) Grupo hipóxico (n=7);
- b) Grupo controle (normóxico) (n=7).

Para avaliar a participação dos hormônios das adrenais nos efeitos da HIA nas atividades proteolíticas e/ou expressão dos genes foram utilizados seis grupos experimentais:

- a) Grupo normóxico *sham* (n=7);
- b) Grupo normóxico adrenaectomizado (n=7);
- c) Grupo normóxico adrenodemedulado (n=7);
- d) Grupo hipóxico *sham* (n=7);
- e) Grupo hipóxico adrenaectomizado (n=7)
- f) Grupo hipóxico adrenodemedulado (n=7).

3.3 Determinação da proteólise em músculos esqueléticos de ratos

Após o ciclo de hipóxia/normóxia, os animais foram pesados e sacrificados por deslocamento cervical numa sequência alternada entre os grupos, removendo-se rapidamente os músculos *soleus* e *extensor digitorius longus* (EDL). Em seguida, os músculos foram pesados em balança eletrônica digital (ACATEC 100), incubados com seus tendões fixados a suportes apropriados em 3 mL de tampão Krebs Ringer-bicarbonato (0,12M de NaCl; 0,015M de NaHCO₃; 4,828mM de KCl; 1,2mM de MgSO₄; 1,212mM de KH₂PO₄; 2,4mM de CaCl₂; 5mM de glicose pH 7,4; 37°C) e aerados.

Este método de quantificação da atividade proteolítica utiliza músculos 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. Desta forma, a proteólise muscular é reduzida, há manutenção dos conteúdos de ATP, de fosfocreatina e glicogênio, reproduzindo-se *in vitro* as características dos músculos em crescimento *in vivo*. Nestas condições, os músculos podem ser mantidos *in vitro* por até 9 horas em boas condições fisiológicas e morfológicas (KETTELHUT; WING; GOLGBERG, 1988, KETTELHUT 1994).

3.3.1 Avaliação da atividade proteolítica

A determinação da proteólise 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 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 reprodutividade, descrito por Waalkes & Udenfriend (1957). Essa liberação de tirosina deve refletir a velocidade de degradação de todas as classes de proteínas celulares, uma vez que este aminoácido é distribuído em todas as proteínas celulares (JEFERSON et al., 1977).

Para a determinação da degradação de proteínas, os músculos foram incubados em 3 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 da pré-incubação, os meios foram renovados, dando assim continuidade da incubação com o mesmo tipo de meio por mais 2 horas. No final desse período, 1 mL do meio será coletado e adicionado a 0,25 mL de ácido perclórico 1,5N para a determinação da tirosina liberada.

3.3.2 Procedimentos experimentais para a avaliação dos sistemas proteolíticos

As vias proteolíticas estudadas em músculos esqueléticos *soleus* e EDL foram a lisossomal, a via dependente de cálcio e a dependente de Ub-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		
<i>COMPONENTES DO MEIO</i>	<i>MÚSCULOS</i>	
	Direito	Esquerdo
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 0,5mM de cicloheximida, que bloqueia a síntese de proteínas por inibir a atividade peptidil transferase da subunidade ribossomal 60S. Essa concentração do inibidor acarreta em redução de 95% na incorporação de ¹⁴C-tirosina em proteína, sendo linear por 3 horas, além de não afetar a atividade proteolítica (FULKS et al.,1975). Para tal ação, a cicloheximida foi utilizada no estudo da determinação da atividade de todas as vias de degradação de proteínas.

B - Sistema dependente de cálcio

Dois protocolos distintos foram utilizados para o estudo do sistema dependente de cálcio. O primeiro protocolo consiste em utilizar os dois músculos contralaterais com seus tendões fixados a suportes, incubando-se um deles em meio Krebs sem cálcio 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 cálcio (tabela 2).

Tabela 2: Protocolo 1 utilizado para a quantificação do sistema dependente de cálcio.

MÚSCULOS (COM TENDÕES FIXOS A SUPORTES)		
RETIRADOS DAS 2 PATAS		
COMPONENTES DO MEIO	MÚSCULOS	
	Direito	Esquerdo
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

No segundo protocolo, um dos músculos é incubado livre, na ausência de suporte, em meio Krebs contendo cálcio. 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 cálcio (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 cálcio, conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3: Protocolo 2 utilizado para a quantificação da atividade máxima do sistema dependente de cálcio.

MÚSCULOS RETIRADOS DAS 2 PATAS		
COMPONENTES DO MEIO	MÚSCULOS	
	Direito	Esquerdo
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4)	+	+
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 cálcio, contendo E64, leupeptina, insulina e BCAA com a finalidade de bloquear simultaneamente as atividades proteolíticas dependente de cálcio 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		
<i>COMPONENTES DO MEIO</i>	<i>MÚSCULOS</i>	
	Direito	Esquerdo
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 (25 µM) e leupeptina (50 µM)	+	+
MG132 (20µM)	-	+

* 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 cálcio, 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).

3.4 Determinação da síntese protéica em músculos esqueléticos de ratos

A síntese total de proteínas foi determinada em músculos *soleus* e EDL incubados com seus tendões fixos a suportes apropriados para a manutenção dos seus comprimentos de

repouso, em tampão Krebs Ringer Bicarbonato, contendo glicose (5mM) e todos os vinte aminoácidos, em condições semelhantes às encontradas no plasma de ratos, conforme apresentados na tabela 5. Estes experimentos foram realizados na presença ou ausência de insulina *in vitro* (0,1 U/mL).

Tabela 5: Aminoácidos adicionados ao meio de incubação (SCHARFF; WOOL, 1996) para avaliação de velocidade de síntese protéica total.

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

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

Após o período de 1 hora de pré-incubação, o meio de incubação foi substituído por meio idêntico acrescido de tirosina marcada [^{14}C]-tirosina; 0,05 $\mu\text{Ci/mL}$ tendo permanecido os

músculos incubados por um período final de 2 horas. Em seguida, os músculos foram removidos de seus suportes e lavados com água destilada fria, secos em papel de filtro e colocados em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após homogeneização e centrifugação a 1800g por 10 minutos, 1 mL do sobrenadante foi utilizado para a avaliação da tirosina livre total no músculo e uma alíquota de 100 µL foi usada na medida da radioatividade, para a determinação da atividade específica da tirosina de cada músculo separadamente. Posteriormente, o precipitado foi lavado 3 vezes com 2 mL de TCA 10%. A dissolução do precipitado final foi obtida pela adição de 1 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, a temperatura ambiente por 12 horas ou em banho-maria a 40°C por 2 horas. A seguir, foram adicionados 10 mL de coquetel de cintilação para contagem da radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB 2100TR, Packard BioScience Company, EUA).

3.5 Teste de tolerância à glicose (GTT)

O GTT avalia a tolerância dos animais a uma sobregarga de glicose e, indiretamente, a sensibilidade à insulina. Os animais foram mantidos em jejum de 24 horas. Foi coletada uma amostra de sangue da cauda dos animais e a concentração plasmática basal de glicose foi quantificada imediatamente por um glicosímetro modelo Accu-Chek[®]. Em seguida, uma solução de glicose (2,0g/Kg de peso de rato) foi administrada aos animais por meio de uma sonda gástrica e amostras de sangue foram coletadas nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose. A variação da concentração de glicose plasmática (concentração de glicose plasmática após administração da solução de glicose subtraída da concentração de glicose plasmática basal) *versus* o tempo foi plotada em gráfico, obtendo-se uma curva exponencial de primeira ordem. A área sob a curva (integral) foi determinada

utilizando o software Origin 8.0 para verificar a tolerância à glicose pela comparação entre as áreas sobre as respectivas curvas glicêmicas dos dois grupos estudados.

3.6 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 animais hipóxicos e controles incubados na presença ou ausência de insulina (0,1 U/mL).

. 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 µCi/µmol) e os músculos foram incubados por mais 2 h 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 espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB 2100TR, Packard BioScience Company, EUA).

3.7 Avaliação da Expressão Gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)

a) Extração de RNA

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

b) Quantificação das amostras de RNA

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

c) Produção de cDNA - Transcrição Reversa (RT)

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

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

d) PCR em tempo real

- Primers utilizados

A seqüência dos primers foi obtida a partir da seqüência dos genes depositada no GenBank para atrogina-1, MuRF1, LC3, GABARAP, BECLIN e ciclofilina (tabela 6).

Tabela 6: Sequências dos *primers* utilizados para as reações de RT-qPCR.

Gene	Sequência	Produto
Atrogina-1	Sense: TGAAGACCGGCTACTGTGGAAGAGAC Antisense: TTGGGGTGAAAGTGAGACGGAGCAG	486 pb
MuRF1	Sense: TCG ACA TCT ACA AGC AGG Antisense: TCC TTG GAA GAT GTC	486 pb
LC3	Sense: TTT GTA AGG GCG GTT CTG Antisense: CAG GTA GCA GGA AGC AGA	486 pb
GABARAP	Sense: CTT TCC CCT TGT TTA CCC TCC Antisense: CCC AAT GTC AAC CCC	486 pb
BECLIN	Sense: GGC CAA TAA GAT GGG TCT GA Antisense: CAC TGC CTC CAG CTT CA	486 pb
Ciclofilina	Sense: GAC TTC ATG ATC CAG GG Antisense: TGA CAT CCT TCA GTG GCT TG	486 pb

-Amplificação do cDNA

Reações de PCR com volume final de 25 μ L foram realizadas utilizando uma concentração final de 0,1 μ M de cada primer (Sense e Antisense), 1,5mM MgCl₂, 1X tampão NH₄⁺, 200 μ M de cada dNTP, 10% DMSO, 2 unidades de Taq Polimerase Pht (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda, MG, Brasil) e 1 μ L de cDNA, o volume final foi completado com água milli Q. O programa utilizado no termociclador PTC100 (MJ Research, Watertown,

MA) foi de 94°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 47° C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos, finalizando com uma etapa de 10 minutos a 72°C. Para ciclofilina, foi de 94°C por 5 minutos, seguido de 22 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56° C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizando com uma etapa de 10 minutos a 72°C. A expressão dos atrogenes (atrogina-1, MuRF1, LC3, GABARAP e BECLIN) foi calculada utilizando a expressão da ciclofilina como normalizador (controle interno endógeno).

3.8. Quantificação do conteúdo protéico dos componentes dos sistemas de degradação de proteínas, caspase-3 e da via de sinalização da Akt em músculo esquelético de ratos

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

Os músculos esqueléticos *soleus* e EDL de ratos foram homogeneizados no Politrom, em 10 volumes de tampão A (5mM de EDTA, 5mM de Tris-HCl pH 7,5, 5mM de DL-ditioneitol (DTT), 50µM MG 132, 1 mg/mL de leupeptina, aprotinina 50 µg/mL, 0,1742mg/mL de PMSF. O homogenado foi centrifugado a 3300 rpm, 4°C, durante 12 minutos. O sobrenadante foi utilizado para quantificação de proteínas totais e o precipitado para proteínas miofibrilares.

Para obter a fração miofibrilar, o precipitado foi lavado 3 vezes em 10 volumes de tampão B (tampão A contendo 1% de triton X-100). Em cada lavagem, o homogenado foi centrifugado a 3300 rpm, 4°C, durante 12 minutos. Após as lavagens, o precipitado foi ressuspenso em 10 volumes de tampão C (8M de uréia, 50mM de Tris-HCl, pH 7,5).

A quantificação de proteína foi feita pelo método de Lowry e colaboradores (1951) e posteriormente utilizadas para identificação do conteúdo das diferentes proteínas. Foi adicionado tampão (solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, 312,5mM de Tris-HCl,

glicerol 50%, 250mM de DTT, azul de bromofenol 5% e pH 6,8 ajustado com 1M de HCl) às amostras.

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.

3.8.2. 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 e colaboradores (1979). Inicialmente, o gel e a membrana de nitrocelulose foram colocados na solução de transferência (48mM de Tris, 39mM de glicina, SDS 10% e 0,2M de metanol). Após a montagem do sistema de transferência, as proteínas presentes no gel de poliácrlamida 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 (0,02M de Tris-HCl, 0,16M de NaCl e 0,1% Tween 20). Após o bloqueio, a membrana foi incubada overnight (aproximadamente 12 horas) a 4°C com anticorpos primários de coelho das seguintes proteínas analisadas: m-calpaína (1:750, Cell Signaling, EUA), μ -calpaína

(1:750, Cell Signaling, EUA), caspase-3 (1:750, Santa Cruz, EUA), Akt (1:750, Cell Signalling, EUA), Akt p-Ser⁴⁷³ (1:500, Cell Signaling, EUA), ou com anticorpo de camundongo para β -actina (1:1000, Santa Cruz, 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 camundongo, diluição de 1:4000 em TBS-T para β -actina, e anti-IgG de coelho, diluição de 1:4000 em TBS-T para μ -calpaína, m-calpaína, caspase-3, diluição de 1:3000 para Akt, e diluição de 1:1000 para Akt p-Ser⁴⁷³). 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 Quimioluminescência Amplificada Amersham ECLTM (Amersham Biosciences). As bandas reveladas foram fotografadas e quantificadas por densitometria utilizando o software ImageJ versão 1.41o (National Institutes of Health, EUA).

3.9 Determinação do glicogênio hepático e muscular

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

3.10 Concentração de catecolaminas plasmáticas e teciduais

A mensuração da atividade simpática foi realizada através das determinações das concentrações das catecolaminas no plasma, no fígado e no músculo EDL. As catecolaminas foram medidas através de método previamente padronizado em nosso laboratório (GARÓFALO et al., 1996). As amostras foram analisadas usando-se HPLC (LC-7A, Shimadzu Instruments) com uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS-2 (5 µm) (Sigma-Aldrich).

3.11 Análises bioquímicas

O sangue foi coletado em tubos heparinizados, após decapitação dos animais. Em seguida, o sangue foi centrifugado para obtenção do plasma e a dosagem plasmática de corticosterona foi realizada através de ensaio radioimunológico de fase sólida, utilizando-se “kit” comercial (DPC-MEDLAB). A dosagem plasmática de insulina foi analisada pelo kit ELISA (Millipore, EUA). Para a dosagem da glicose plasmática, foi coletada uma gota de sangue da cauda dos animais e colocada na fita teste e a leitura foi feita no glicosímetro Accu-chek®.

3.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos como Médias ± EPM (Erro Padrão da Média). Para a análise estatística dos resultados entre os grupos controle e hipóxico foi empregado o teste “*t*” de *Student* (pareado ou não pareado). Para a comparação dos valores obtidos na síntese

protéica e oxidação de glicose foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e o nível de significância utilizado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do modelo experimental

Para a caracterização de nosso modelo experimental a massa de diferentes tecidos assim como vários parâmetros metabólicos e hormonais foram determinados após 8 horas de exposição à hipóxia. Verifica-se na figura 1 que o evento hipóxico agudo não alterou a massa corporal (figura 1A) e esquelética (figura 1B) dos animais. Entretanto, as massas do tecido adiposo branco (TAB) retroperitoneal e epididimal foram reduzidas em 30% nos animais hipóxicos, quando comparados aos seus respectivos controles (figura 1C).

A figura 2 mostra que a concentração plasmática de glicose (mg/dL) em animais hipóxicos ($110 \pm 3,7$) foi significativamente maior do que seus controles ($76 \pm 1,9$). Entretanto, o conteúdo de glicogênio hepático (figura 3A) reduziu 97% no grupo hipóxico em relação ao grupo controle. O conteúdo do glicogênio em músculos *soleus* e EDL (Figura 3B) não foi diferente entres os grupos experimentais.

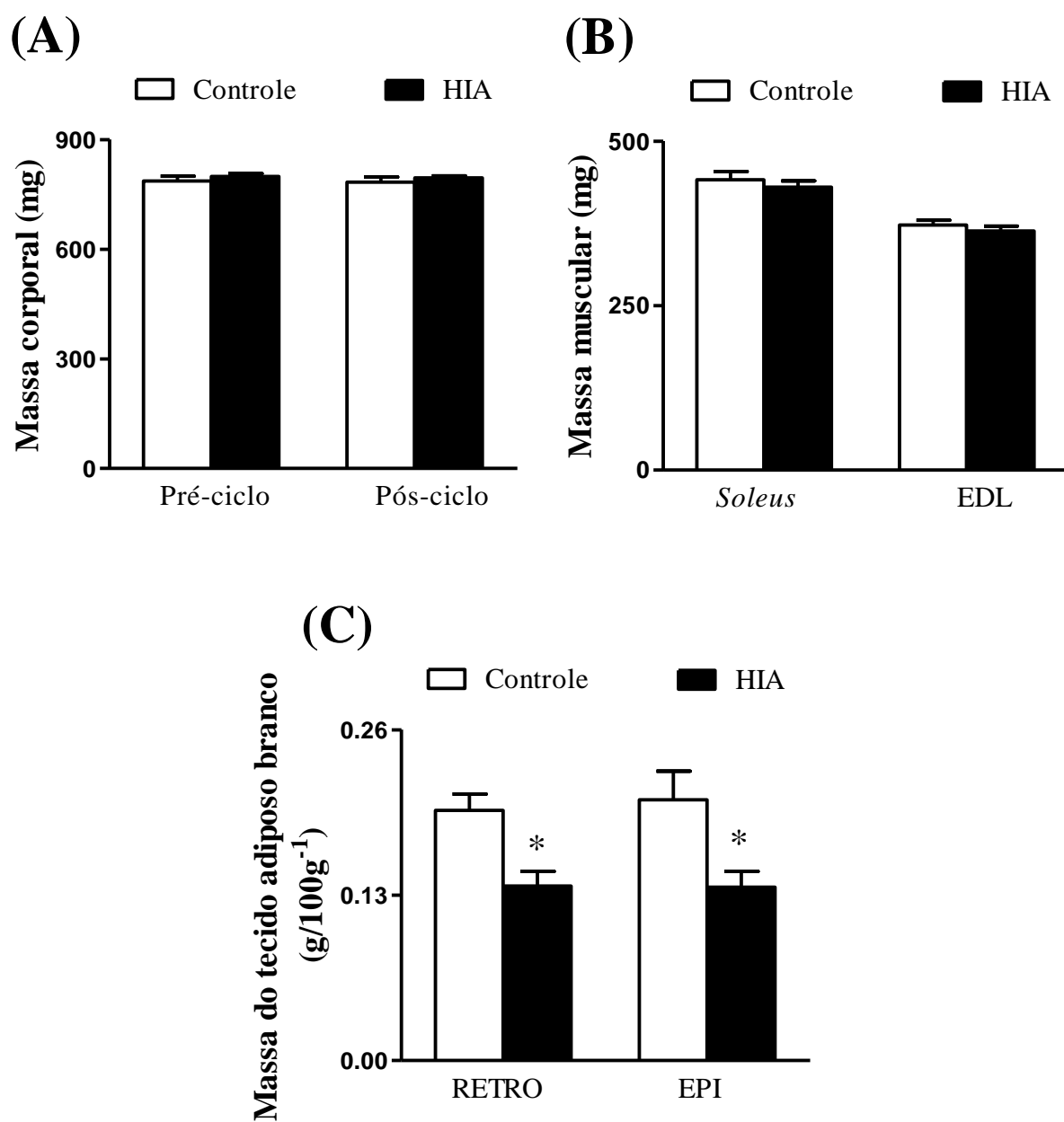


Figura 1. Massa corporal (A), dos músculos esqueléticos (*soleus* e EDL; B) e do tecido adiposo branco (retroperitoneal e epididimal; C) em animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). Os valores são expressos como Média ± EPM (n=8), * p ≤ 0,05.

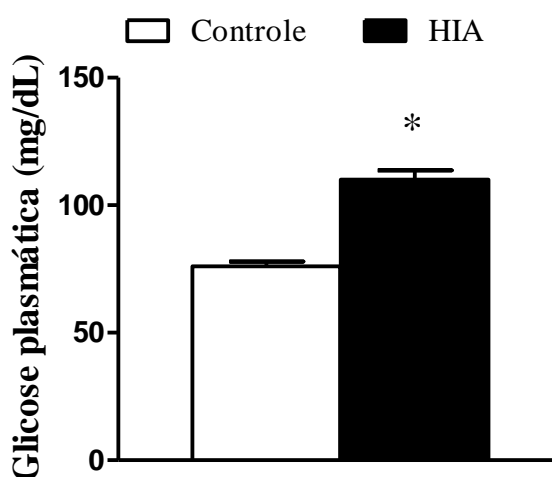


Figura 2. Concentração plasmática de glicose em animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). Os valores são expressos como Média \pm EPM (n=9), * $p \leq 0,05$.

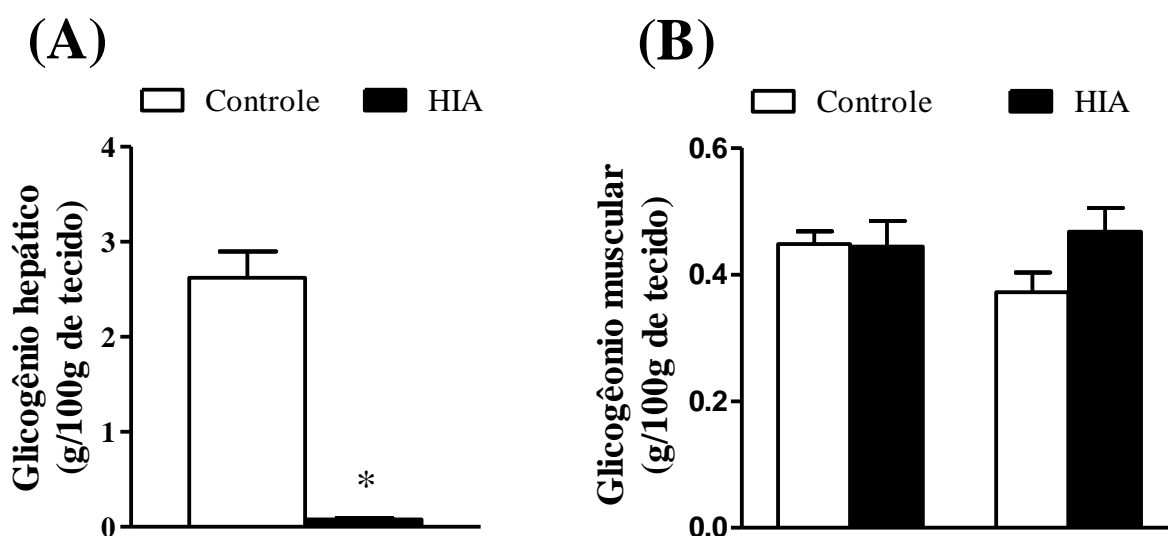


Figura 3. Conteúdo de glicogênio hepático (A) e muscular (B) em animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). Os valores expressos são como Média \pm EPM (n=7), * $p \leq 0,05$.

A insulina plasmática ($\mu\text{UI/mL}$) em animais hipóxicos aumentou comparada aos animais controles (Controle: $9,5 \pm 0,7$; HIA: $27,7 \pm 5,6$). A concentração plasmática de corticosterona ($\mu\text{g/dL}$), entretanto, não apresentou alteração significativa entre o grupo hipóxico e controle (Controle: $16,2 \pm 0,5$; HIA: $14,0 \pm 0,9$). O mesmo ocorreu com as

concentrações plasmáticas das catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) (figura 4A) e noradrenalina no músculo EDL (figura 4B), que diferiram entre os grupos estudados. A concentração das catecolaminas no fígado, por outro lado, apresentou aumento significativo nos animais hipóxicos em relação aos controles (figura 4B).

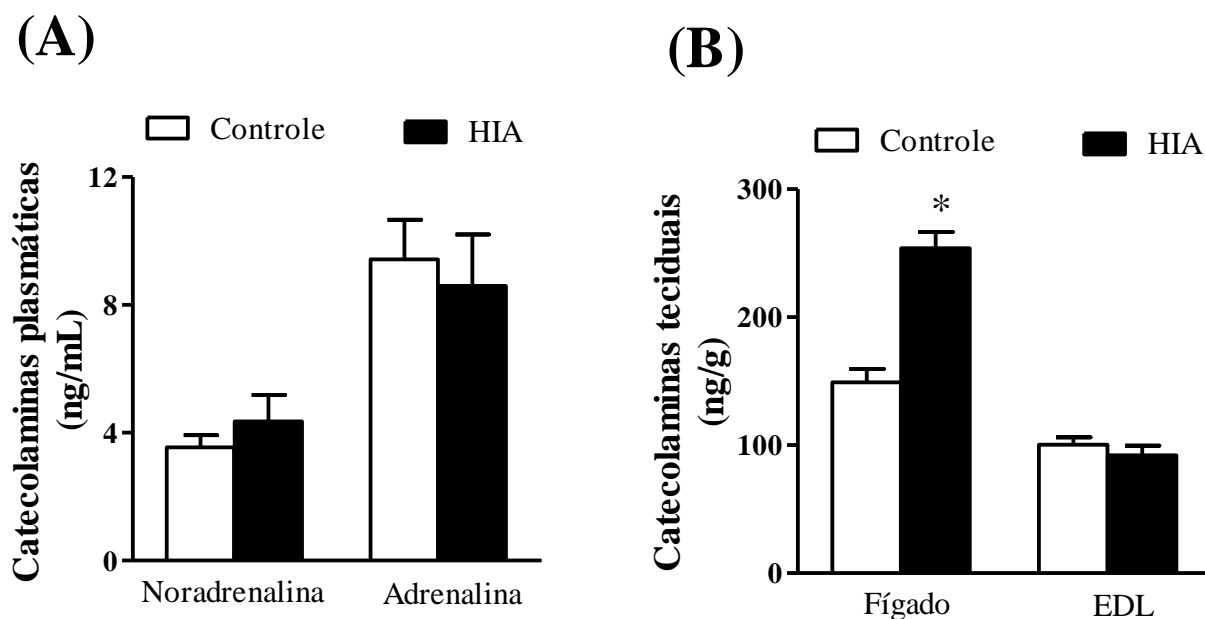


Figura 4. Catecolaminas plasmáticas (A) e teciduais (B) em animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). Os valores expressos são como Média \pm EPM (n=7), * $p \leq 0,05$.

4.2 Efeito da HIA na tolerância à glicose

Para melhor compreender os mecanismos envolvidos na hiperglicemia dos animais hipóxicos, foi realizado o teste de tolerância à glicose (GTT). A concentração plasmática de glicose inicial (mg/dL) (tempo 0) em animais hipóxicos foi significante maior do que os controles, como pode ser observado na figura 5A (Controle: $75 \pm 2,8$; HIA: $109 \pm 4,6$). No entanto, o grupo hipóxico não apresentou diferença em relação ao grupo controle, após a análise da área sob a curva (figura 5B).

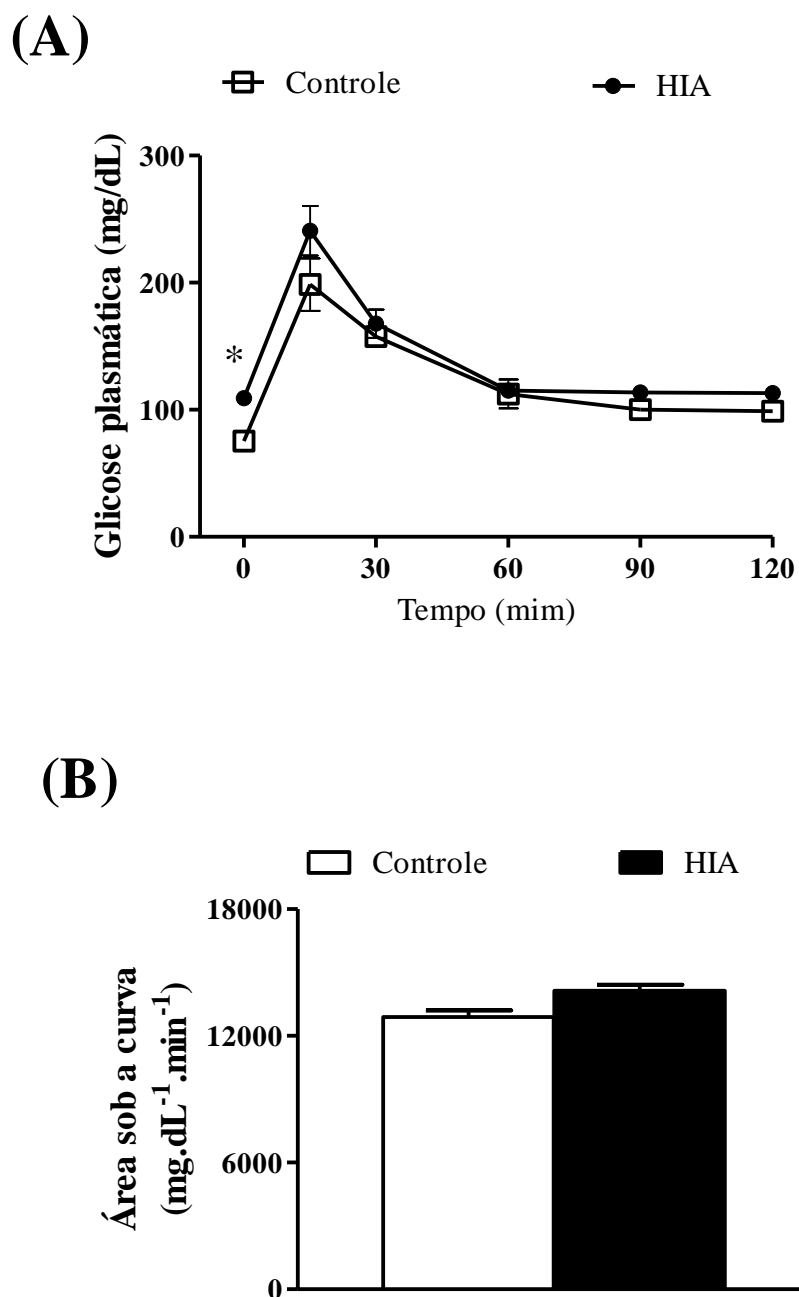


Figura 5. Teste de tolerância à glicose (GTT) *in vivo* em animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). A) Regressão linear da média dos valores da glicemia após a administração de uma carga oral de glicose (2g/kg). B) Área sob a curva da resposta glicêmica. Os valores expressos são como Média \pm EPM (n=6). * $p \leq 0,05$.

4.3 Efeito da HIA no metabolismo de proteínas em músculos isolados de ratos

4.3.1 Velocidade de síntese e degradação de proteínas musculares

Após a caracterização do modelo experimental, investigou-se o efeito da HIA na síntese protéica, degradação total de proteínas e na atividade dos diferentes sistemas proteolíticos em músculos *soleus* e EDL.

A velocidade de síntese de proteínas foi avaliada por meio da incorporação do aminoácido tirosina marcada com ^{14}C em proteínas totais de músculos *soleus* e EDL isolados de ratos submetidos à HIA, em duas situações distintas: síntese basal e síntese estimulada na presença de insulina. Como esperado, a síntese protéica aumentou na presença de insulina em ambos os músculos estudados (figura 6). Tanto a atividade basal como a estimulada é maior em músculos *soleus* quando comparados a músculos EDL. A hipóxia não alterou a síntese protéica nas duas situações analisadas em músculos *soleus* e EDL (figura 6).

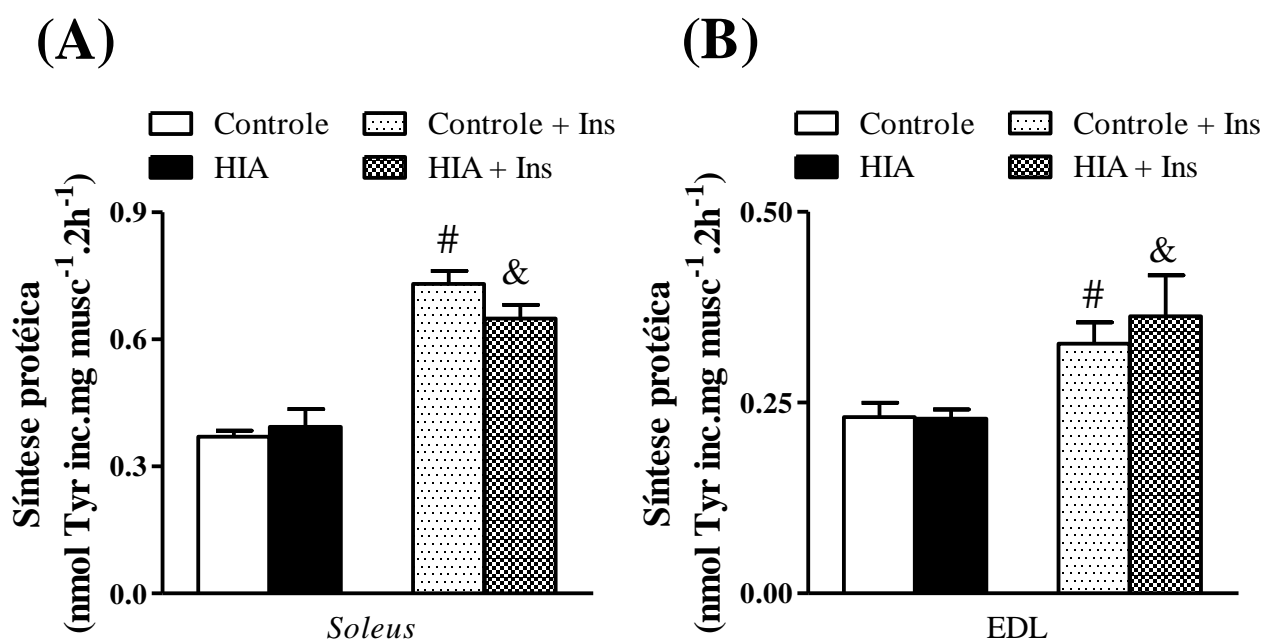


Figura 6. Síntese protéica na presença ou não de insulina em músculos *soleus* (A) e EDL (B) de animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). Os valores são expressos como Média \pm EPM (n=7). [#] Controle *versus* Controle + Ins; [&] HIA *versus* HIA + Ins; $p \leq 0,05$. Ins: Insulina.

Ao contrário dos processos de síntese, pouco se sabe sobre o efeito da hipóxia na degradação de proteínas musculares. Dessa forma, a etapa seguinte do presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito agudo da hipóxia intermitente na degradação de proteínas totais.

A degradação de proteínas foi estimada por meio da liberação de tirosina no meio de incubação, na presença de um inibidor da síntese protéica. A figura 7 apresenta os valores médios obtidos na proteólise total e reflete a soma de todos os sistemas proteolíticos envolvidos com a degradação protéica intracelular. A hipóxia, como observado nessa figura, aumentou a degradação total de proteínas em músculos *soleus* e EDL, em 17% e 19%, respectivamente.

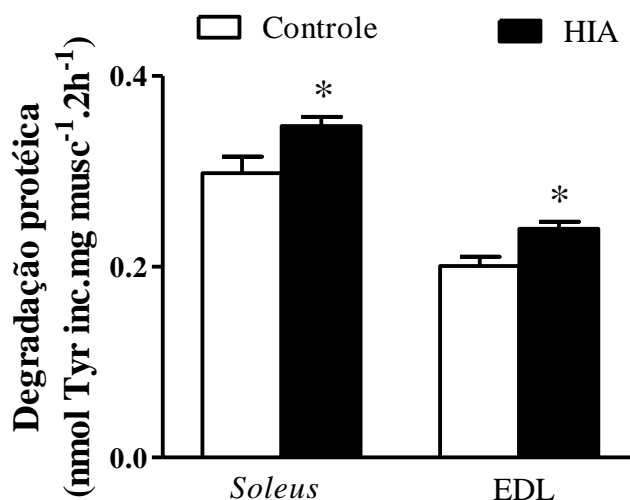


Figura 7. Degradação protéica em músculos *soleus* e EDL de animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). Os valores são expressos como Média \pm EPM (n=7) * P \leq 0.05.

4.3.2 Atividades dos sistemas proteolíticos em músculos esqueléticos

Em seguida, procedeu-se a investigação de qual(is) sistema(s) proteolítico(s) estaria(m) envolvido(s) no aumento da resposta catabólica induzida pela hipóxia em músculos *soleus* e EDL. Para isso, foi analisado o efeito da HIA nas atividades das vias proteolíticas: Ub-proteassoma, dependente de cálcio e lisossomal.

A proteólise observada em animais hipóxicos foi acompanhada por um aumento na atividade das vias proteolíticas dependente de Ub-proteassoma e dependente de cálcio em músculos *soleus* (17% e 58%, respectivamente) e EDL (40% e 48%), conforme demonstrado na figura 8A e 8B, respectivamente. A atividade do sistema proteolítico lisossomal não foi alterada nos dois músculos estudados. Pode-se também claramente observar na figura 8A que o aumento da atividade proteolítica Ub-proteassoma induzido pela hipóxia é muito maior em músculos EDL do que em músculos *soleus*.

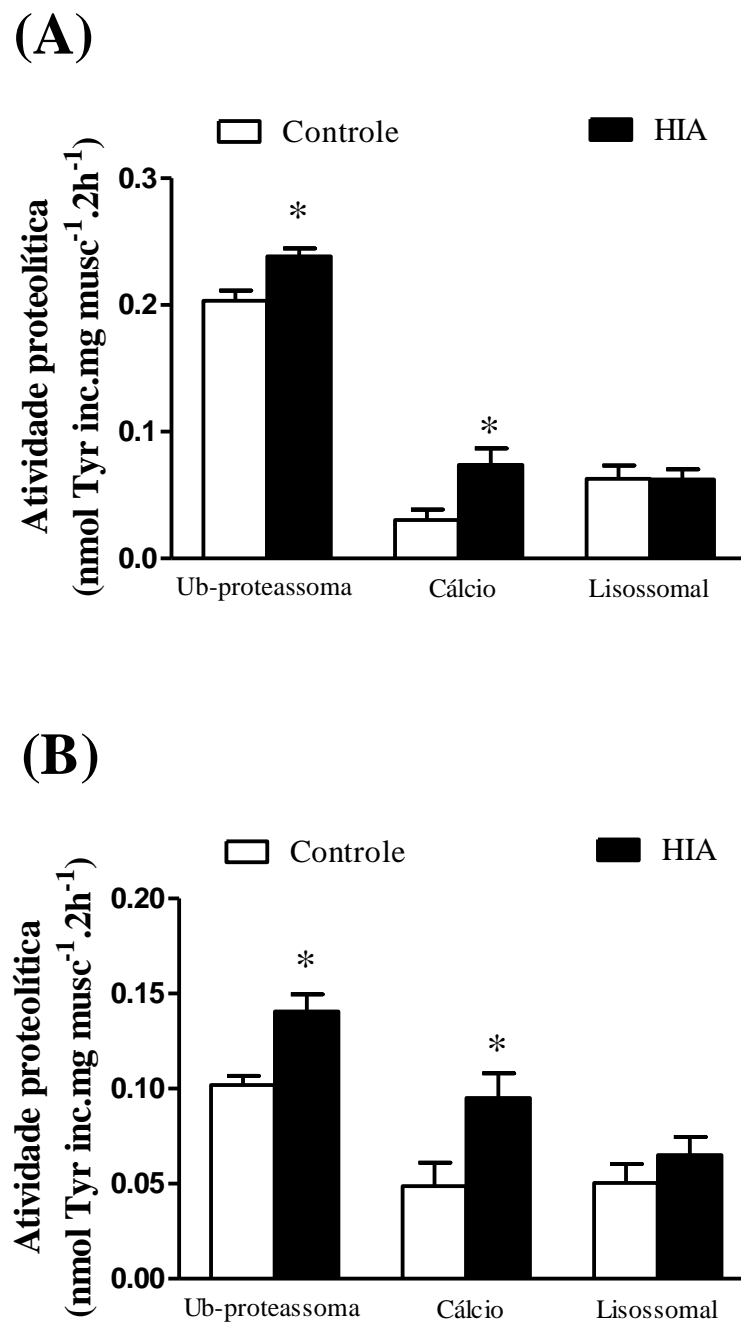


Figura 8. Atividade das diferentes vias proteolíticas em músculos *soleus* (A) e EDL (B) de animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). Os valores são expressos como Média \pm EPM (n=7) * $P \leq 0.05$. Ub: Ubiquitina.

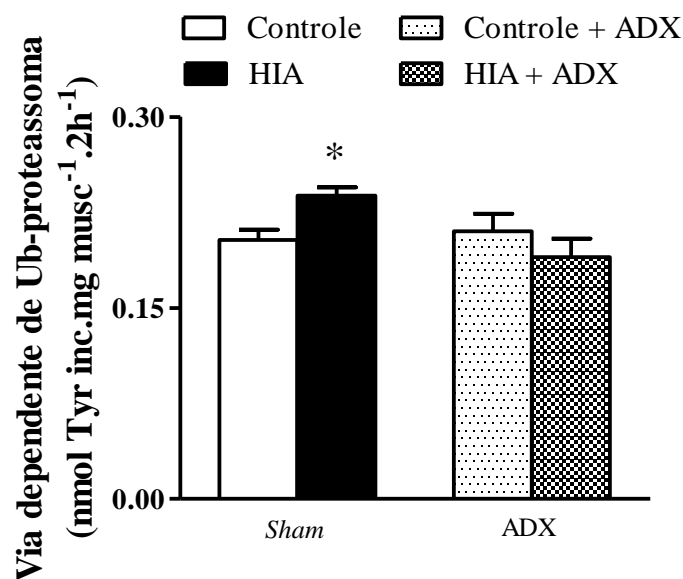
Em seguida, o presente trabalho teve como objetivo investigar o mecanismo hormonal envolvido com a ativação das vias proteolíticas pela hipóxia intermitente aguda. Mais

especificamente, avaliou-se a participação dos glicocorticóides no controle do metabolismo de proteínas musculares nesse modelo experimental. Para isso, foram utilizados animais submetidos à adrenalectomia bilateral ou à cirurgia fictícia.

A figura 9 apresenta a atividade do sistema proteolítico Ub-proteassoma em músculos *soleus* e EDL de animais *sham* e adrenalectomizados submetidos à HIA. Pode-se observar que a adrenalectomia não interferiu na atividade basal da via Ub-proteassoma nos dois músculos estudados, uma vez que os valores desta atividade proteolítica dos grupos controle *sham* e controle adrenalectomizados não diferiram estatisticamente. Verifica-se também nesta figura que a adrenalectomia preveniu completamente a elevação da atividade desta via proteolítica em músculos *soleus* (figura 9A) e EDL (9B) de animais hipóxicos quando comparados aos animais *sham*.

Sabendo-se que a remoção completa da glândula adrenal também resulta na depleção das concentrações plasmáticas das catecolaminas e que estes hormônios interferem no metabolismo de proteínas musculares (NAVEGANTES et al., 2000), foi realizado um experimento adicional no qual avaliou-se o efeito da HIA na atividade proteolítica Ub-proteassoma em músculos EDL de animais submetidos à adrenodemedulação (remoção seletiva da porção medular da glândula, deixando-se intacta a porção cortical). De forma semelhante aos animais controles, observa-se que a hipóxia aumenta a atividade proteolítica nos músculos dos animais adrenodemedulados, indicando assim que o componente da adrenal responsável pelo aumento da atividade Ub-proteassoma em resposta à HIA é provavelmente o glicocorticóide.

(A)



(B)

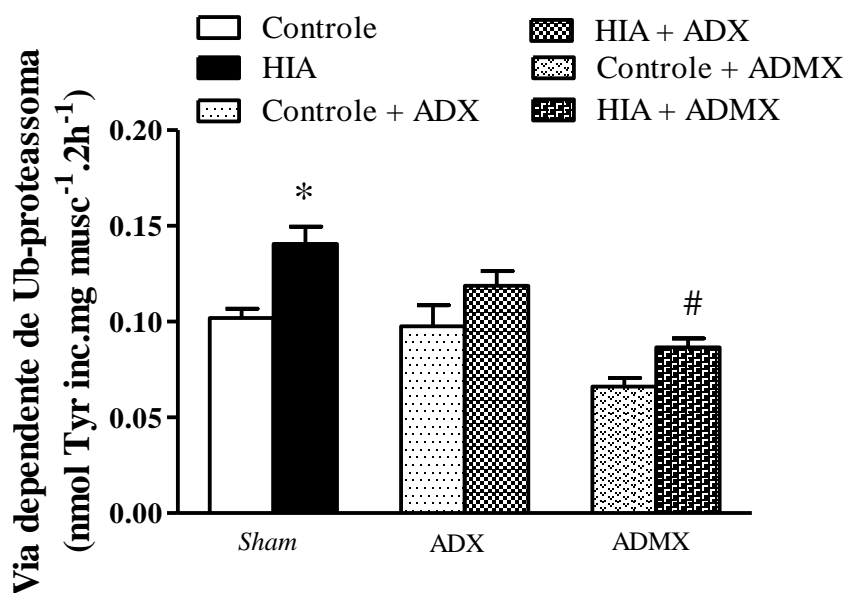


Figura 9. Atividade do sistema proteolítico Ub-proteassoma em músculos *soleus* (A) e EDL (B) de animais *sham*, adrenalectomizados (ADX) e adrenodemedulado (ADMX) expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA) ou normóxia (controle). Os valores expressos são como Média \pm EPM (n=7) * HIA *sham* versus Controle *sham*; # HIA ADMX versus Controle ADMX; $P \leq 0.05$. Ub: Ubiquitina.

O segundo sistema proteolítico testado foi o dependente de cálcio, em músculos EDL. Verifica-se na figura 10, que a adrenalectomia também não influenciou a atividade basal desse componente proteolítico. Observa-se ainda nessa figura que o efeito catabólico da hipóxia na atividade da via proteolítica dependente de cálcio foi atenuada pela adrenalectomia, indicando que os glicocorticóides também participam deste efeito.

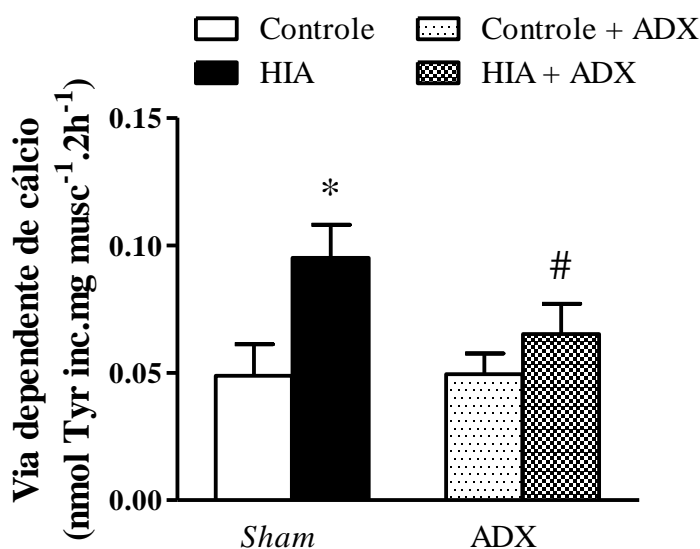


Figura 10. Atividade do sistema dependente de cálcio em músculos EDL de animais *sham* e adrenalectomizados (ADX) expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA) ou normóxia (controle). Os valores expressos são como Média \pm EPM (n=7) *HIA *sham* versus Controle *sham*; # HIA ADX versus Controle ADX; $P \leq 0.05$.

4.4 Efeito da HIA na expressão dos atrogenes

Após ter sido identificada a hiperativação dos sistemas proteolíticos dependentes de ubiquitina-proteassoma e cálcio em músculos *soleus* e EDL de ratos hipóxicos, o presente trabalho passou a investigar as alterações que estariam ocorrendo na expressão dos genes relacionados à atrofia e autofagia.

A figura 11 apresenta os resultados da expressão gênica de atrogina-1 e MuRF1, duas ubiquitina-ligases, em músculos *soleus* (A) e EDL (B) de animais adrenalectomizados

expostos à HIA e controles. Observa-se que a HIA aumentou a expressão gênica de atrogina-1 e MuRF1 em músculos *soleus* (~3x) e EDL (~2x), enquanto que a adrenalectomia preveniu completamente o aumento destes genes em animais hipóxicos nos dois músculos estudados. Esses resultados evidenciam a participação dos glicocorticóides na ativação do programa atrófico em músculos esqueléticos de ratos submetidos à HIA.

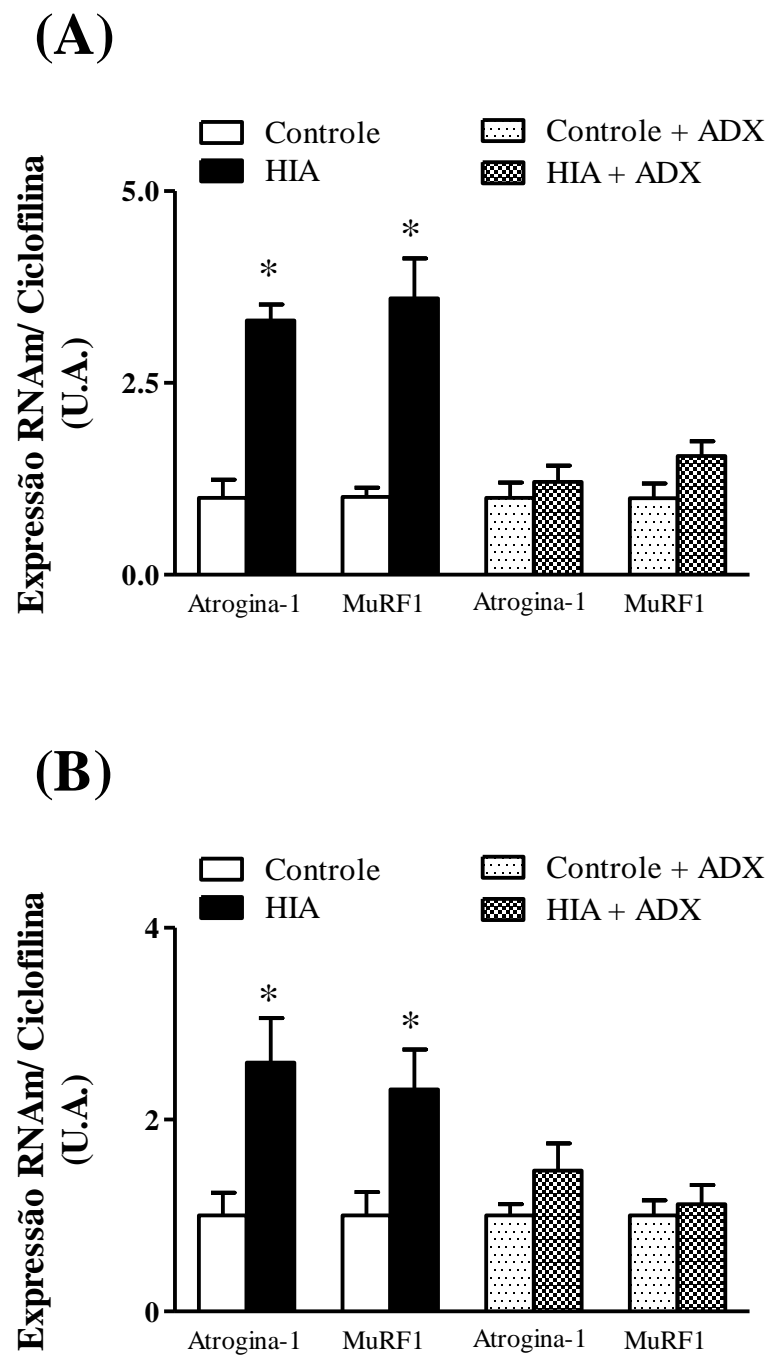


Figura 11. Expressão gênica das ubiquitina-ligasas (atrogina-1, MuRF1) em músculos *soleus* (A) e EDL (B) de animais *sham* e adrenalectomizados (ADX) expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA) ou normóxia (controle). Os resultados são expressos como Média \pm EPM (n=7). * $p \leq 0,05$.

A figura 12 apresenta os resultados da expressão gênica dos marcadores do processo autofágico LC3 e GABARAP em músculos *soleus* (A) e EDL (B) de animais adrenalectomizados expostos à HIA. Verifica-se nessa figura que a HIA aumentou a expressão gênica de LC3 (~2x) e GABARAP (~2x) em ambos os músculos estudados. Observa-se também que a adrenalectomia não influenciou a expressão desses dois genes, que continuaram apresentando aumento de sua transcrição após o estímulo hipóxico. Esses resultados sugerem que a expressão de genes relacionados à atrofia e autofagia é controlada por mecanismos distintos durante o evento hipóxico agudo. Enquanto a expressão de atrogina-1 e MuRF1 é regulada por um mecanismo dependente do glicocorticóide, os genes LC3 e GABARAP são regulados independentemente da ação deste hormônio.

Por outro lado, a expressão gênica de BECLIN, outro marcador do processo autofágico não foi alterado pelo HIA (figura 13).

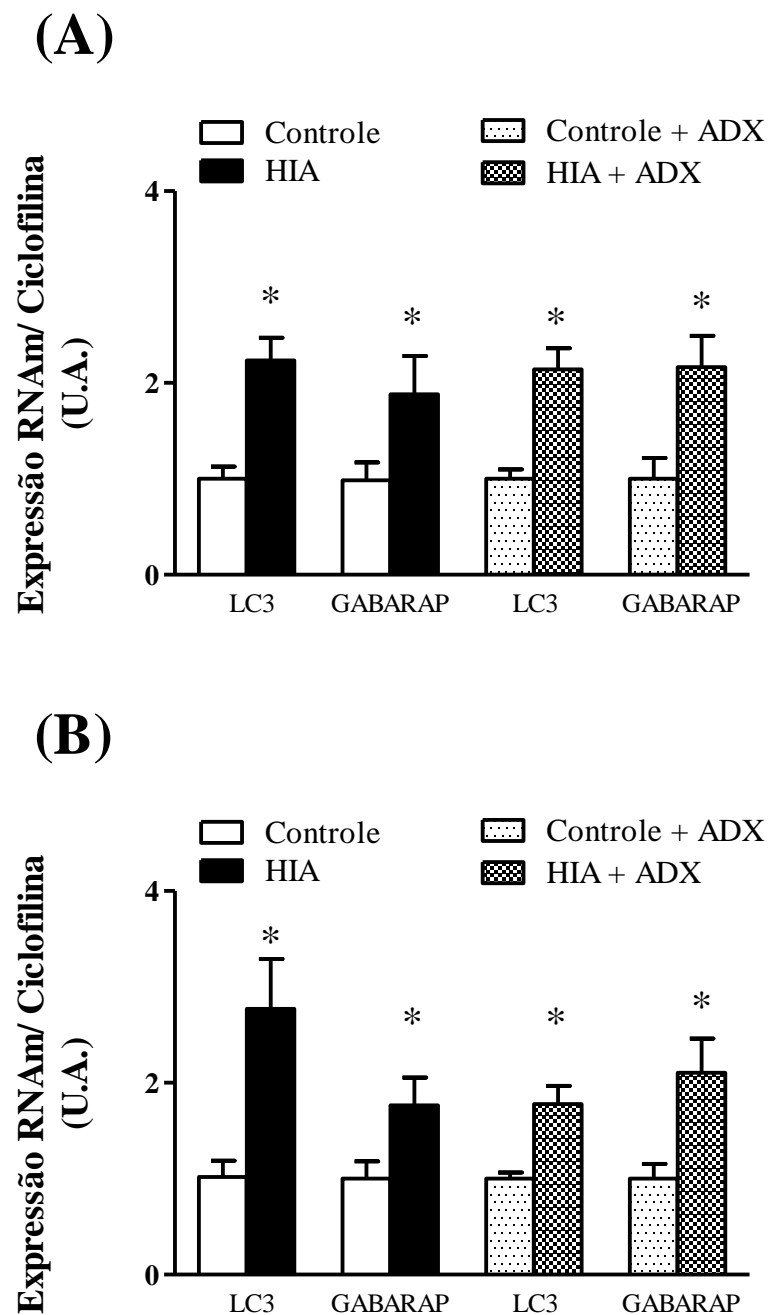


Figura 12. Expressão gênica dos marcadores do processo autofágico LC3 e GABARAP, em músculos *soleus* (A) e EDL (B) de animais *sham* e adrenalectomizados (ADX) expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA) ou normóxia (controle). Os resultados são expressos como Média \pm EPM (n=7). * $p \leq 0,05$.

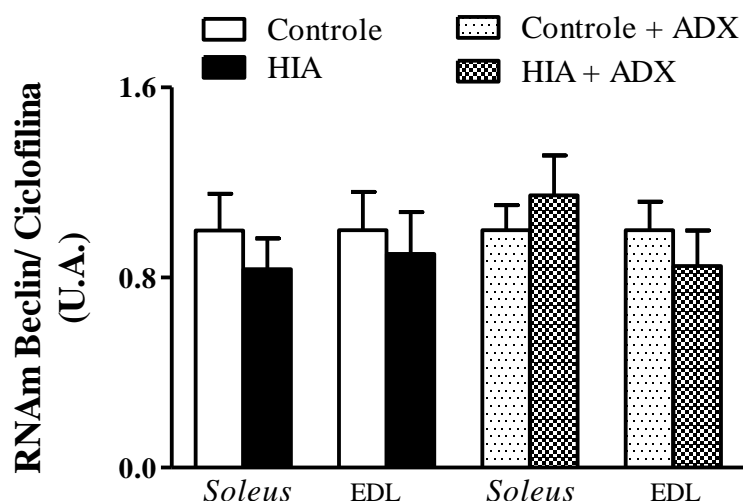


Figura 13. Expressão gênica de BECLIN, marcador do processo autofágico, em músculos *soleus* e EDL de animais *sham* e adrenalectomizados (ADX) expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA) ou normóxia (controle). Os resultados são expressos como Média \pm EPM (n=7).

4.5 Efeito da HIA no conteúdo protéico dos componentes dos sistemas de degradação de proteínas e caspase-3

Como a atividade do sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma e a expressão do atrogenes em animais submetidos à HIA mostraram-se aumentados em relação aos controles, avaliou-se o processo de ubiquitinação das proteínas por meio da quantificação do conteúdo dos conjugados de poli-ubiquitina em músculos EDL. Como pode ser verificado na figura 14 a HIA aumentou 20% o conteúdo protéico de conjugados poli-ubiquitinados, confirmando os achados de que a atividade do sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma em músculos EDL é alterada pela hipóxia.

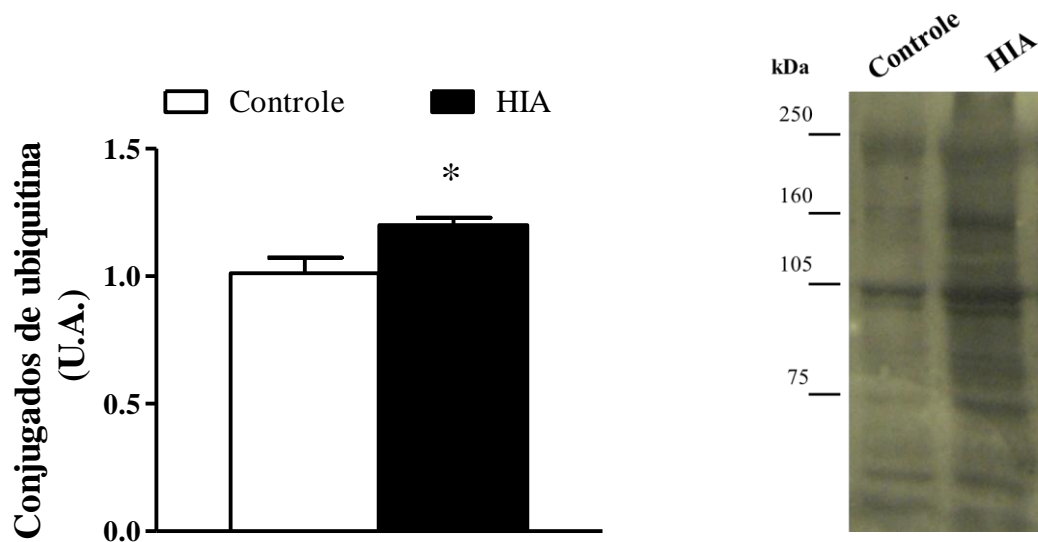


Figura 14. Conteúdo protéico dos conjugados de ubiquitina (fração miofibrilar) em músculos EDL de animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). Os valores são expressos como Média \pm EPM (n=8) * $P \leq 0.05$.

Procedeu-se também a investigação do conteúdo protéico dos componentes implicados na via dependente de cálcio: as proteases (μ - e m-calpaína). A figura 15 mostra os conteúdos protéicos das formas autolisada (ativa) e não autolisada (inativa) das μ -calpains em músculos EDL de ratos controles e hipóxicos. Não há diferença entre a expressão das formas autolisada e não autolisada da μ -calpaína em músculos EDL de animais controles. No entanto, em músculos de animais hipóxicos, a forma predominante é a autolisada. O aumento do conteúdo da μ -calpaína em sua forma autolisada nos músculos dos animais hipóxicos foi de aproximadamente 56% em relação aos controles indicando que a HIA aumentou a forma ativa desta enzima proteolítica. Como se pode verificar, também na figura 15, o conteúdo total (estimado pela somatória das análises densitométricas da protease em suas duas formas) da μ -calpaína não mostrou alteração entre os grupos hipóxicos e controles. Também não se observou diferença significativa entre o conteúdo protéico da m-calpaína em músculos EDL de animais controles e hipóxicos (figura 16).

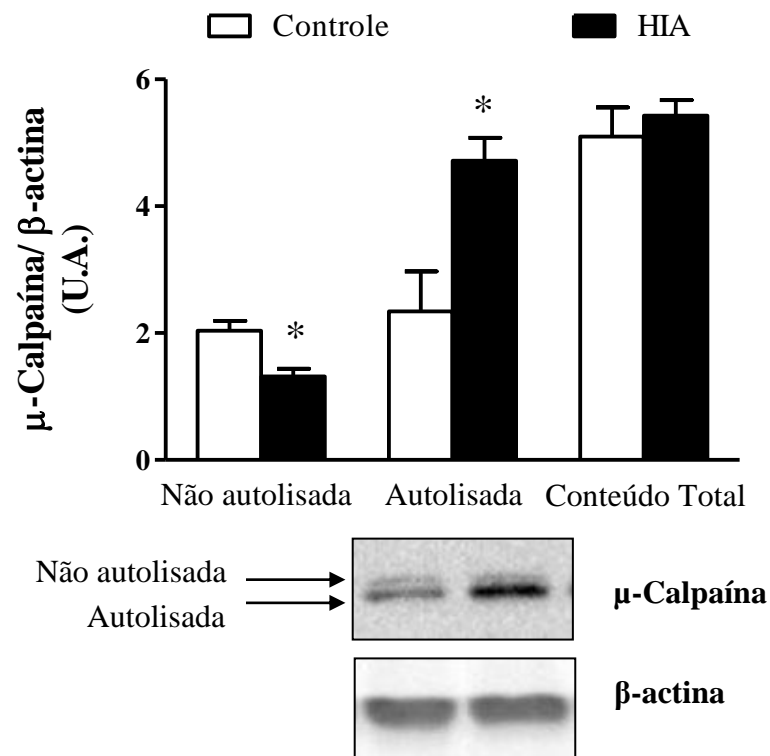


Figura 15. Conteúdo protéico de μ -calpaína não autolisada (80 kDa) e autolisada (75 kDa) corrigido por β -actina em músculos EDL de animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). Os valores são expressos como Média \pm EPM de 4 músculos e representa um experimento que foi repetido 2 vezes, sendo obtido resultados semelhantes.* $P \leq 0.05$.

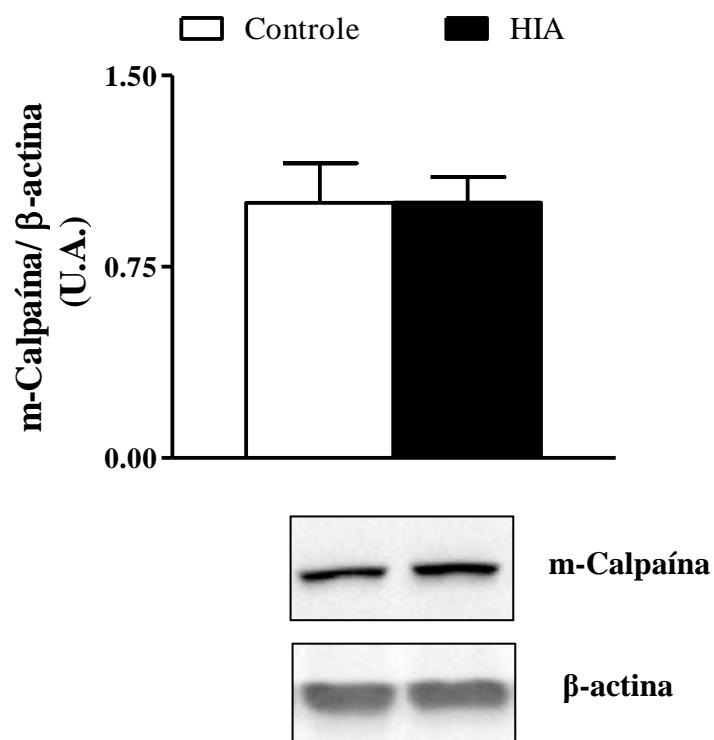


Figura 16. Conteúdo protéico de m-calpaína (80 kDa) corrigido por β -actina em músculos EDL de animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). Os valores são expressos como Média \pm EPM (n=6).

Adicionalmente, foi analisado o conteúdo protéico de caspase-3, para avaliar a morte celular por apoptose. Como observado na figura 17, o conteúdo protéico não foi diferente entre os grupos estudados.

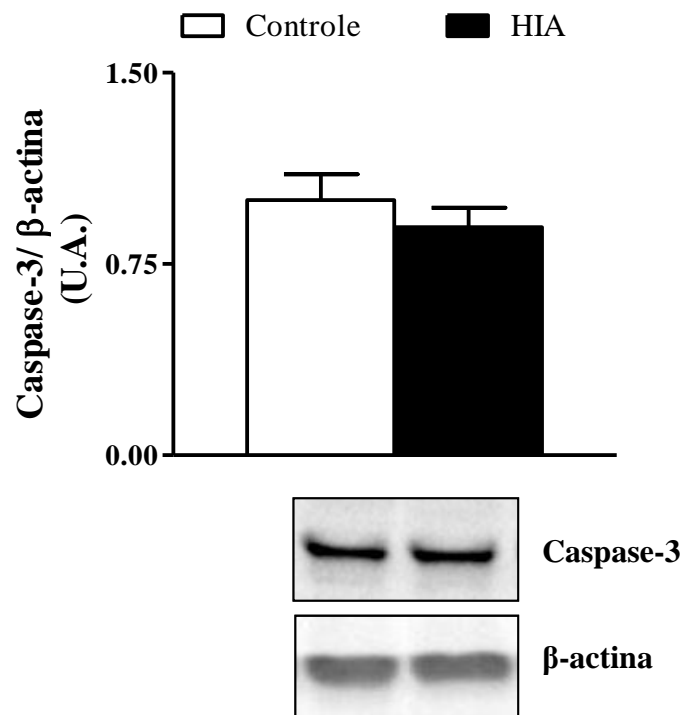


Figura 17. Conteúdo protéico de caspase-3 (20 kDa) corrigido por β -actina em músculos EDL de animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). Os valores são expressos como Média \pm EPM (n=6).

4.6 Efeito da HIA na oxidação de glicose em músculos esqueléticos

É bem sabido que a ativação do programa atrofico na musculatura esquelética resulta também na redução de genes relacionados com a fosforilação oxidativa ou síntese de ATP, e consequentemente, na redução da oxidação de glicose. Dessa forma, investigou-se no presente estudo as taxas de oxidação de glicose em músculos *soleus* e EDL de animais controles e hipóxicos. Para isso, os músculos foram incubados na presença ou não de insulina e a oxidação estimada por meio da incorporação da marca radioativa em CO_2 . Como por ser observado na figura 18, ocorreu uma redução de 40% na taxa basal de oxidação de glicose em músculos EDL (18B). Este efeito, entretanto, não é observado em músculos *soleus* (18A). A adição de insulina ao meio de incubação de músculos da pata contralateral do mesmo animal aumentou a oxidação de glicose em *soleus*, mas este efeito não foi diferente entre o grupo

hipóxico e controle (figura 18A). Em músculos EDL, a insulina não aumentou as taxas de oxidação de glicose no grupo controle, mas preveniu a redução da oxidação induzida pela hipóxia (figura 18B).

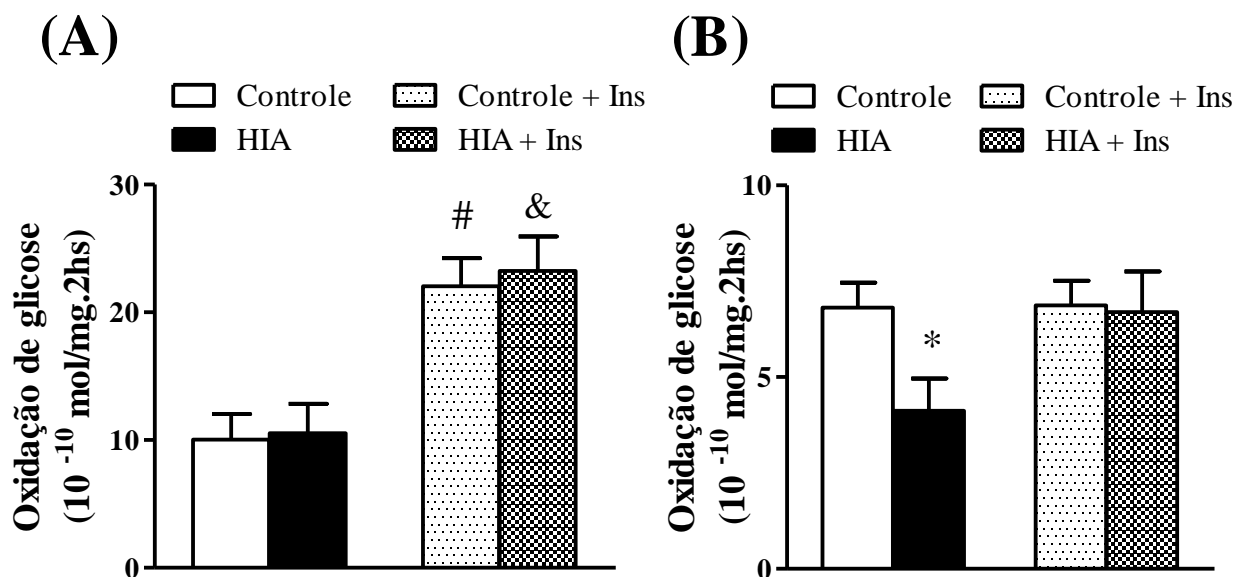


Figura 18. Oxidação de glicose em músculos *soleus* (A) e EDL (B), incubados de animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). Os valores expressos são como Média \pm EPM (n=7) [#] Controle + Ins *versus* Controle; [&] HIA + Ins *versus* HIA; ^{*} HIA *versus* Controle; P \leq 0.05. Ins: Insulina.

4.7 Efeito da HIA na fosforilação da Akt no músculo esquelético

A Akt é uma proteína chave no controle da síntese e degradação protéica dependente de ubiquitina-proteassoma. Quando fosforilada por hormônios anabólicos, como a insulina, torna-se ativa estimulando a síntese protéica e inibindo a degradação de proteínas. Dessa forma, para avaliar a participação desta proteína na via de sinalização intracelular envolvida na resposta catabólica induzida pela HIA, analisou-se a fosforilação da Akt (resíduo Ser⁴⁷³) em músculos *soleus* e EDL de animais controles e hipóxicos. Como pode ser observado na figura 19, em músculos *soleus* a HIA reduziu 50% a fosforilação da Akt, sugerindo o

envolvimento dessa via de sinalização no efeito proteolítico em animais hipóxicos. Apesar da tendência à redução, verifica-se que em EDL a fosforilação da Akt não é alterada. O conteúdo protéico desta quinase não foi alterado em ambos os músculos do grupo hipóxico.

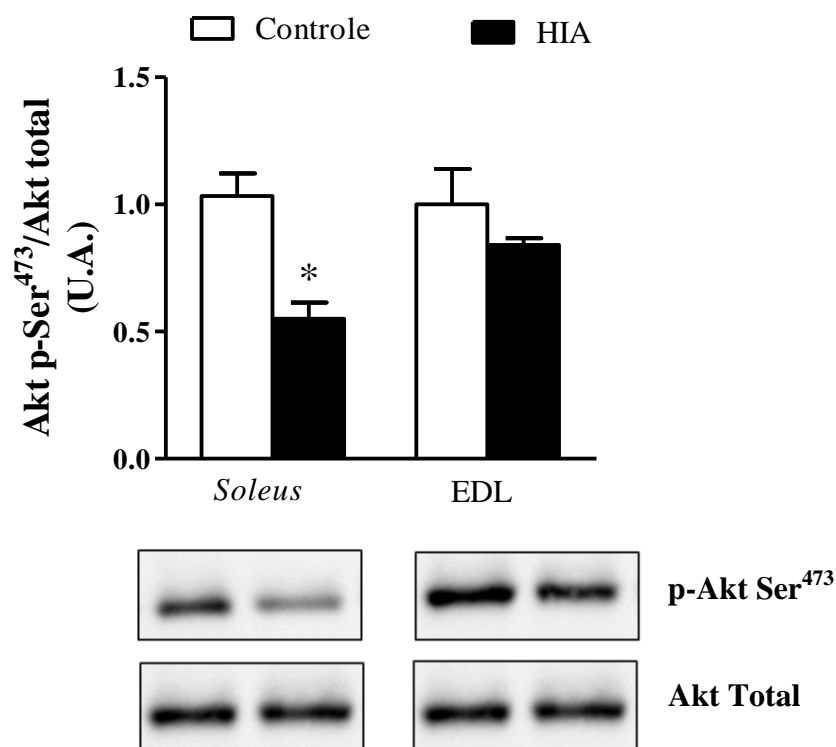


Figura 19. Fosforilação da Akt em resíduos de Serina (Ser⁴⁷³) em músculos *soleus* e EDL de animais controles e expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA). Os valores são expressos como Média \pm EPM (n=7) * $P \leq 0.05$.

5 DISCUSSÃO

Estudos anteriores de nosso laboratório mostraram que ratos expostos à hipóxia intermitente, durante 9 dias, apresentaram menor velocidade de crescimento corporal e perda de massa muscular esquelética (FÁBIO, 2009). Para melhor compreender os mecanismos envolvidos com este tipo de atrofia muscular ao longo do tempo, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos agudos da hipóxia intermitente, por 8 horas, nos processos de síntese e degradação de proteínas em músculos oxidativos (*soleus*) e glicolíticos (EDL) de ratos jovens.

Sabendo-se que as ações da hipóxia são difusas no organismo e que muito pouco se sabe acerca dos efeitos *in vivo* desse tipo de estresse no metabolismo intermediário, tornou-se necessário, inicialmente, caracterizar as alterações metabólicas e hormonais induzidas pela HIA em nossos animais. Como se pode observar a exposição aguda à hipóxia intermitente resultou em hiperglicemia (figura 2) e hiperinsulinemia nos animais sugerindo um quadro de resistência periférica a este hormônio. Esse aumento da glicose plasmática ocorreu, muito provavelmente, devido ao aumento da glicogenólise no fígado, que resultou na drástica redução do conteúdo do glicogênio hepático (figura 3A) e liberação de glicose na corrente sanguínea. É razoável supor que outras vias metabólicas envolvidas com a homeostase glicêmica podem também ter contribuído para este efeito como, por exemplo, a ativação da neoglicogênese e a redução da captação periférica de glicose. Nos animais hipóxicos as massas do tecido adiposo branco (TAB) retroperitoneal e epididimal (figura 1C) foram reduzidas, em relação aos controles. No entanto, essa redução não é atribuída à redução da massa corporal, uma vez que esta não diferiu entre os grupos (figura 1A). A redução do TAB indica, indiretamente, aumento da lipólise. O fato do conteúdo de noradrenalina ter sido aumentado no fígado dos animais hipóxicos (figura 4B) indica que as respostas catabólicas

induzidas pela HIA no fígado e no TAB são, provavelmente, o resultado do aumento da atividade do Sistema Nervoso Simpático (SNS). De fato, está bem estabelecido, que a hipóxia intermitente é um poderoso estímulo da atividade simpática (BRAGA et al., 2006), que sabidamente aumenta a mobilização de triacilglicerol no TAB e ativa a produção hepática de glicose (neoglicogênese e glicogenólise) Essas ações adrenérgicas são importantes em situações de estresse para o fornecimento de glicose para tecidos que utilizam como fonte energética exclusivamente esta hexose (como o SNC), e também para a maior disponibilidade de ácidos graxos e glicerol no plasma, os quais podem ser utilizados como substratos energéticos alternativos e como fonte de carbonos para a neoglicogênese, respectivamente.

É bem estabelecido que tanto o SNS como o eixo hipotálamo-hipófise adrenal são estimulados em resposta ao estresse. Estudos anteriores realizados em camundongos previamente canulados e expostos a ciclos de hipóxia intermitente demonstraram aumento do ritmo de secreção dos glicocorticóides que cursa em fase com a redução máxima da tensão de O₂ (YOKOE et al., 2008). A razão de não termos observado efeito semelhante em nosso modelo experimental pode estar relacionada ao fato da coleta de sangue ter sido feita por decapitação e não de forma seriada e em animais acordados como no estudo anterior. Sabendo-se então que os glicocorticóides sabidamente estimulam a neoglicogênese hepática mediante o aumento da atividade de enzimas chaves como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e a glicose-6-fosfatase (G6Pase) (LEI et al., 1996; PUIGSERVER et al., 2003) pode-se sugerir que estes hormônios também contribuíram para o aumento da glicemia observado no grupo hipóxico do presente estudo. Os glicocorticóides também interferem diretamente na sinalização da insulina, um hormônio chave no controle do metabolismo intermediário que é responsável por promover a síntese e armazenamento de carboidratos, lipídeos e proteínas, e inibir a quebra e liberação destes para a corrente sanguínea (PESSIN; ALTIER, 2000; SALTIEL, 2001).

O comprometimento da ação da insulina nos tecidos periféricos caracteriza a resistência ao hormônio (FUJIMOTO, 2000; PETERSEN; SHULMAN, 2002). Portanto, o aumento da glicemia plasmática induzido pela HIA poderia ser explicado por uma alteração na sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos em resposta aos glicocorticóides. No entanto, esta hipótese é descartada uma vez que os animais hipóxicos responderam de forma semelhante aos controles após os testes de tolerância à glicose (GTT) (figura 5B). Por outro lado, os animais hipóxicos apresentaram uma secreção aumentada de insulina que pode ser interpretada como uma resposta compensatória do pâncreas na tentativa de controlar a concentração de glicose no sangue. Essa resposta pode levar os tecidos periféricos a uma resistência à insulina. E de fato, alguns trabalhos demonstram que a hipóxia intermitente causa resistência à insulina em humanos e camundongos (LIYORI et al., 2006; LOUIS; PUNJABI, 2009; REINKE et al., 2011) independentemente da ativação simpática e associada à menor utilização de glicose pelas fibras musculares oxidativas (LIYORI et al., 2006).

A etapa seguinte desse presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos agudos da hipóxia intermitente nos processos de síntese e degradação protéica em músculos *soleus* e EDL de ratos. É bem estabelecido que a hipóxia prolongada contribui para o desenvolvimento da atrofia muscular (HOPPELER et al., 1990; DEBIGARE et al., 2001). Uma condição comum em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é a fraqueza muscular esquelética relacionada com a atrofia de músculos periféricos (BERNARD, 1998). No entanto, os mecanismos moleculares que levam à perda da massa muscular esquelética nessas condições ainda não são conhecidos. Há evidências *in vitro* de que a hipóxia aguda inibe a síntese protéica tanto em células musculares C2C12 (ARTHUR et al., 2000) como em músculos esqueléticos isolados de ratos (MANCHESTER; YOUNG, 1959; PREEDY; SUGDEN, 1989) e em músculos de pacientes com DPOC (MORRISON et al., 1988).. Estes resultados foram corroborados por um estudo prévio de nosso laboratório que demonstrou que

a velocidade de síntese protéica foi 25% menor em músculos *soleus* e EDL de ratos expostos à HIC por 9 dias quando comparados a seus respectivos controles (FÁBIO, 2009). Nesse estudo a redução da síntese foi associada à perda de massa em ambos os músculos e à menor área de secção transversa de fibras oxidativas do tipo II em *soleus*. Entretanto, os resultados do presente estudo mostram que, diferentemente da hipóxia crônica, a exposição à hipóxia intermitente por 8 horas não alterou a velocidade de síntese protéica total nesses músculos (figura 6). Estes resultados estão de acordo com os estudos *in vitro* de Caron e colaboradores (2009) que demonstraram redução das taxas de síntese protéica em miotúbulos L6 expostos à hipóxia durante 48 horas, sem que houvesse nenhuma alteração nas primeiras 24 horas. Em conjunto, esses resultados indicam a regulação temporal do anabolismo protéico frente ao estímulo hipóxico.

São inexistentes na literatura trabalhos que tenham investigado as vias de degradação de proteínas em músculo esquelético de animais e humanos submetidos à hipóxia intermitente *in vivo*. As primeiras evidências foram obtidas em estudos recentes do nosso laboratório que demonstraram que a hipóxia intermitente crônica por 9 dias reduz a degradação total de proteínas musculares em ratos jovens (FÁBIO, 2009). Considerando que os músculos desses animais estavam atrofiados nesse modelo experimental e o processo de síntese protéica reduzido, concluiu-se que a perda de massa havia sido decorrente principalmente da redução do anabolismo protéico e que a redução da proteólise representava um mecanismo adaptativo do músculo em resposta à baixa tensão de O₂. No presente trabalho verificou-se que um único ciclo de hipóxia já aumenta a proteólise total tanto em músculos *soleus* como em EDL (figura 7). A análise conjunta desses resultados mostra claramente o efeito bifásico da hipóxia nos processos de degradação de proteínas musculares de ratos jovens e reforça a hipótese da participação de mecanismos antiproteolíticos adaptativos em fases mais crônicas de exposição a este tipo de estresse no sentido de proteger a massa muscular. Respostas temporais

semelhantes têm sido observadas em outros modelos experimentais de atrofia como o jejum (KETTELHUT et al., 1994), o diabetes (PEPATO et al., 1996) e a simpatectomia (NAVEGANTES et al., 1999). Embora a natureza desses processos adaptativos frente ao estímulo hipóxico prolongado ser ainda completamente desconhecida, pode-se especular a participação do SNS que, como discutido anteriormente, é ativado nesse modelo. Essa idéia é proveniente de estudos anteriores de nosso laboratório que demonstraram que tanto a adrenalina como a noradrenalina são capazes de inibir a proteólise total em músculos esqueléticos de ratos normais *in vitro* e *in vivo* (NAVEGANTES et al., 2002). Uma outra possibilidade é que a redução da proteólise observado em situações de exposições mais prolongadas à hipóxia seja decorrente de uma maior facilitação à ação da insulina. De fato, em experimentos recentes de nosso laboratório verificou-se que esses animais desenvolvem hipersensibilidade à insulina, estimada por meio do ITT (dados não mostrados). Além das respostas compensatórias hormonais, é bem estabelecido que a hipóxia per se ativa fatores de transcrição, sensíveis a diminuição da tensão de O₂, que tem como função a regulação da expressão de um conjunto de genes que levam a tolerância à hipóxia. Entre estes fatores de transcrição, o mais importante parece ser o HIF-1 (fator de transcrição induzido por hipóxia). O HIF-1 é um fator transcricional heterodimérico e consiste de uma subunidade α , regulada por oxigênio, e uma subunidade β , constitutivamente expressa. Em situações hipóxicas, o HIF-1 α é translocado para o núcleo, onde ocorre a dimerização com a subunidade HIF-1 β e o recrutamento de coativadores transcricionais e a subsequente ligação aos genes alvos responsivos à hipóxia. Todas as respostas fazem parte de extensa reprogramação da célula normóxica para a geração de uma célula mais tolerante à hipóxia (HOCHACHKA et al., 1996).

A proteólise total no tecido muscular representa a participação concomitante de todos os sistemas de degradação protéica (lisossomal, dependente de cálcio e dependente de Ub-

proteassoma). Por isso, tornou-se interessante investigar qual(is) via(s) proteolítica(s) estaria(m) implicada(s) na degradação total dos músculos esqueléticos dos animais hipóxicos. Como mostrado na figura 8, houve um aumento na atividade das vias proteolíticas dependente de Ub-proteassoma e dependente de cálcio em músculos *soleus* e EDL, sendo que não houve mudança na atividade do sistema proteolítico lisossomal. Já é bem descrito na literatura que o sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma é o principal responsável pela degradação de grande parte das proteínas miofibrilares durante diferentes situações catabólicas como por exemplo o câncer, diabetes, desnervação e insuficiência renal crônica. Entretanto, nunca havia sido demonstrado a ativação desse sistema em uma situação de hipóxia aguda. De fato, o presente estudo mostra um aumento de 17% e 40% na atividade proteolítica dependente de Ub-proteassoma em músculos *soleus* (figura 8A) e EDL (figura 8B) de ratos hipóxicos, respectivamente. Pode-se claramente observar na figura 8 que este aumento induzido pela hipóxia é muito maior em músculos EDL do que em músculos *soleus*. Já é bem descrito na literatura que músculos tipicamente glicolíticos ricos em fibras do tipo II como o EDL são muito mais responsivos aos efeitos proteolíticos de patologias sistêmicas quando comparados aos músculos oxidativos. Em vários estados catabólicos como no diabetes (PEPATO et al., 1996; BAVIERA et al., 2008), jejum (LI et al., 1977; WING et al., 1995), no tratamento com glicocorticóides (WING et al., 1993) e na acidose (MITCH, 1995), existe uma maior atrofia muscular no EDL do que no *soleus*. Por outro lado, músculos vermelhos, constituídos por fibras do tipo I, de metabolismo predominantemente oxidativo como o *soleus*, são mais responsivos aos sinais catabólicos provenientes de situações de desuso ou inatividade (ex: desnervação, imobilização, etc.) quando comparados aos músculos glicolíticos. A razão destas diferenças fenotípicas ainda não é totalmente conhecida, mas parece estar relacionada à maior expressão de PGC1-alfa, um coativador transcricional do PPAR-gama, envolvido na

supressão da expressão das Ub ligases (atrogina-1 e MuRF1), em músculos tipicamente oxidativos (SANDRI et al., 2006).

Sabe-se que a maior atividade do proteassoma em músculos de animais sob privação alimentar (SOLOMON et al., 1998; LECKER et al., 1999) ou submetidos ao tratamento com glicocorticóides (WING et al., 1993) é acompanhada pelo aumento do conteúdo de proteínas poliubiquitinadas (WING et al., 1995; LECKER et al., 1999). Como pode ser verificado na figura 14, a HIA aumentou em 20% o conteúdo protéico de conjugados poli-ubiquitinados em músculos EDL, corroborando os achados de que a atividade do sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma é realmente estimulada pela hipóxia. Esse aumento do processo de ubiquitinação em diferentes situações atroficas é dependente da hiperexpressão das Ub ligases, atrogina-1 e MuRF1 (SACHECK et al., 2007), as duas principais proteínas envolvidas no reconhecimento dos substratos protéicos a serem degradados pelo proteassoma. Observou-se no presente trabalho um aumento de aproximadamente 3 vezes em músculos *soleus* (figura 11A) e 2 vezes em EDL (figura 11B) na expressão gênica da atrogina-1 e MuRF1 em ratos hipóxicos. Esses achados estão de acordo com as observações de que a atividade do proteassoma e a expressão da atrogina-1 estão aumentadas em miotúbulos L6 expostos continuamente a hipóxia 1% O₂ (CARON et al., 2009).

Outro sistema proteolítico analisado em músculos *soleus* e EDL de ratos hipóxicos foi o dependente de cálcio. Observou-se um importante aumento da atividade dessa via nos dois músculos estudados (58% e 48%, respectivamente) (figura 8). O sistema proteolítico dependente de cálcio conta com a atividade de cisteína proteases conhecidas como calpaínas (COSTELLI et al., 2005). Duas isoformas têm recebido mais atenção da comunidade científica: a μ -calpaína e m-calpaína. Essas denominações fazem referências às concentrações de cálcio *in vitro* necessárias para as ativações das mesmas. O mecanismo básico que resulta na ativação do componente proteolítico dependente de cálcio depende do aumento da

sensibilidade das calpains ao cálcio citosólico (SAIDO et al., 1994). Isso é resultante de um processo autoproteolítico (autólise) que remove um pequeno fragmento de ambas as subunidades da calpaína, gerando assim uma nova forma da molécula, a qual é ativa em concentrações de cálcio muito próximas às aquelas encontradas no citosol (GOLL et al., 1991). Muito embora o conteúdo total das duas isoformas das calpains não tenha sido alterado pela HIA, observou-se no presente trabalho que a forma autolisada (ativa) da subunidade de 75kDa da μ -calpaína foi aumentada, enquanto que a forma não autolisada (inativa) praticamente desapareceu em EDL de ratos expostos à HIA (figura 15). Estes resultados são evidências indiretas de que a atividade enzimática da μ -calpaína em músculos EDL de ratos foi aumentada pela HIA, sendo este efeito muito provavelmente decorrente do aumento de cálcio intracelular promovido pela hipóxia (HIDALGO; DONOSO, 2008). De fato, diferentes estudos anteriores já haviam demonstrado uma correlação entre o influxo de cálcio e a ativação das calpains em cardiomiócitos (LIZUKA et al., 1992) e músculos esqueléticos (FAGAN et al., 1992) expostos ao estresse hipóxico agudo in vitro. No entanto, este efeito proteolítico da hipóxia nunca havia sido descrito em condições experimentais in vivo.

O sistema proteolítico lisossomal e a expressão da caspase-3 também foram avaliados em músculos *soleus* e EDL de ratos hipóxicos, não sendo encontradas diferenças estatísticas entre os grupos estudados. E embora não se tenha detectado alterações na atividade do sistema lisossomal em animais hipóxicos (figura 8), a expressão do RNAm da LC3 e GABARAP no músculo *soleus* (figura 12A) e EDL (12B) foi aumentada em duas vezes. É importante salientar, no que diz respeito ao processo autofágico, que a LC3 e a GABARAP possuem 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., 2004; OGATA, et al., 2010). Portanto, nossos dados

mostram pela primeira vez na literatura que há ativação da autofagia em músculos esqueléticos de ratos jovens submetidos à HIA.

A hiperexpressão de genes relacionados à atrofia (Atrogina e MuRF1) e autofagia (LC3 e GABARAP) em nosso modelo experimental indica que houve ativação do “programa atrófico”. De acordo com vários autores esta programação gênica ocorre em diferentes tipos de atrofia muscular e se caracteriza pela ativação ou supressão de um conjunto de 120 genes, denominados de atrogenes (LECKER et al., 2004). Entre aqueles que são supressos estão genes relacionados com a fosforilação oxidativa ou síntese de ATP. Acredita-se que esta supressão gênica seja importante para a redução da produção de energia e trabalho celular em situações críticas (LECKER et al., 2004), como por exemplo a hipóxia. Para comprovar esta hipótese, avaliou-se o efeito da HIA na oxidação de glicose em músculos *soleus* e EDL incubados na ausência ou presença da insulina. Os resultados apresentados na figura 18 mostram que músculos hipóxicos e controles respondem de forma semelhante ao efeito estimulatório da insulina na oxidação de glicose. Entretanto, em situações basais, a HIA resulta em menor oxidação de glicose em músculos EDL, mas não em músculos *soleus*. De fato, tem sido mostrado que a hipóxia reduz a atividade enzimática das vias oxidativas, o número de mitocôndrias e aumenta a conversão de fibras musculares oxidativas em glicolíticas (FAUCHER et al., 2005). Sabe-se que a principal fonte de energia para as células durante um evento hipóxico agudo é obtida a partir da ativação da glicólise, isto é, do desdobramento do glicogênio das células em piruvato, que por sua vez é convertido em ácido láctico (GUYTON, 2002). O aumento da glicólise anaeróbica é uma importante estratégia de adaptação celular à hipóxia, especialmente em tecidos excitáveis como o cérebro, o coração e músculo esquelético visto que a homeostasia iônica e a integridade funcional destes tecidos são dependentes de um constante suprimento de energia. Estes resultados, em conjunto, sugerem que a HIA é um evento catabólico que também resulta na ativação do “programa

atrófico” em músculos esqueléticos de ratos jovens. O fato da oxidação de glicose não ter sido alterada em músculos *soleus* pode ser devido a sua maior capacidade oxidativa frente ao estímulo hipóxico quando comparado ao EDL. A ativação desse programa gênico resultou na maior ativação do processo de ubiquitinação de proteínas miofibrilares e, conseqüentemente, na maior oferta de substratos protéicos ao proteassoma. O resultado final desse processo é maior degradação de proteínas musculares e ao longo do tempo perda de massa muscular esquelética.

Para avançar no conhecimento das vias de sinalizações envolvidas com as alterações do sistema Ub-proteassoma induzidas pela hipóxia aguda, investigou-se nesse trabalho a atividade da Akt, por meio da quantificação de sua forma fosforilada. 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). 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). O presente trabalho mostra que, em paralelo ao aumento da degradação total de proteínas, da atividade proteolítica Ub-proteassoma, do conteúdo dos conjugados poli-ubiquitinados e da expressão do RNAm dos atrogenes, a hipóxia aguda reduziu a fosforilação da Akt no músculo *soleus*. Observou-se também uma importante tendência à redução da fosforilação dessa quinase no músculo EDL de ratos hipóxicos (figura 19). Resultados semelhantes foram encontrados em miotúbulos L6 expostos continuamente a hipóxia 1% O₂ (CARON et al., 2009) e em músculos *soleus* expostos a hipóxia crônica por 16 dias (FAVIER et al., 2010). Com base em evidências anteriores (SANDRI et al., 2004), pode-se sugerir que a inativação da Akt em sua forma desfosforilada, nessas diferentes situações de exposição à hipóxia, pode ter prevenido a fosforilação de FoxO e com isso favorecido a permanência desse fator de transcrição no núcleo, levando à ativação da transcrição das Ub

ligases (atrofina-1 e MuRF1) e dos genes autofágicos (LC3 e GABARAP). Faz-se necessária a realização de experimentos adicionais para a comprovação dessa hipótese.

Considerando que diversas condições catabólicas estão associadas ao aumento dos níveis circulantes de glicocorticóides (LECKER et al., 1999) e a hipóxia é um importante estímulo para ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (YOKOE et al., 2008), tornou-se interessante investigar o mecanismo hormonal envolvido com a ativação dessas vias proteolíticas pela HIA. Para isso, avaliou-se a participação dos glicocorticóides no controle do metabolismo de proteínas musculares através da adrenalectomia bilateral.

Verificou-se que a adrenalectomia preveniu completamente o aumento da atividade da via proteolítica Ub-proteassoma (figura 9) e dos genes relacionados à atrofia (atrofina-1 e MuRF1) (figura 11) em músculos *soleus* e EDL em animais expostos a HIA. Esses dados sugerem que os glicocorticóides secretados pela glândula adrenal participam da resposta proteolítica induzida pela HIA e estão de acordo com diferentes trabalhos da literatura que mostram que estes hormônios aumentam a degradação de proteínas principalmente pela ativação da proteólise dependente de Ub-proteassoma (WING; GOLDBERG, 1993) e aumento do conteúdo protéico de conjugados com Ub (MEDINA et al., 1991) e expressão das Ub ligases (WING; GOLDBERG, 1993), em situações catabólicas como sepse, acidose, jejum (WING; GOLDBERG, 1993; LECKER et al., 1999; MARINOVIC et al., 2002) e o diabetes (HU et al., 2009). Um dado adicional que reforça a hipótese da participação dos glicocorticóides no efeito proteolítico induzido pela HIA é a observação de que o aumento da atividade da via proteolítica Ub-proteassoma é muito maior em músculos EDL (figura 8A) do que em *soleus* (figura 8B). Isso ocorre provavelmente porque músculos glicolíticos são mais susceptíveis à ação proteolítica dos glicocorticóides quando comparados aos músculos oxidativos. Sabe-se que a atrofia induzida por glicocorticóides é caracterizada pela redução das fibras de contração rápida ou fibras musculares do tipo II (ex: EDL), com menor ou nenhum

impacto nas fibras de contração lenta ou fibras musculares do tipo I (ex: *soleus*) (DEKHUIJZEN et al., 1995; FOURNIER et al., 2003). No entanto, os mecanismos que levam a essa especificidade ainda não são conhecidos (SCHAKMAN et al., 2008).

Vale a pena ressaltar que a remoção completa da glândula adrenal utilizada no presente trabalho resulta também na depleção das catecolaminas plasmáticas que também interferem no metabolismo de proteínas alterando a síntese (NAVEGANTES et al., 2004) e a degradação de proteínas musculares (NAVEGANTES et al., 1999). Portanto, para investigar a participação das catecolaminas nas respostas metabólicas induzidas pela HIA, removeu-se exclusivamente a porção medular da glândula adrenal, deixando-se intacta a porção cortical, o que resultou na depleção das concentrações plasmáticas das catecolaminas, principalmente adrenalina, sem alteração das concentrações de corticosterona (GRAÇA, 2010). E de forma semelhante aos animais controles, observou-se um aumento na atividade da via proteolítica Ub-proteassoma em músculos EDL de animais adrenodemedulados expostos à HIA (figura 9), indicando assim que o aumento desta via proteolítica frente ao estímulo hipóxico ocorre em resposta aos glicocorticóides e não às catecolaminas. Corroborando com esses achados, a atividade simpática muscular, avaliada indiretamente pelo conteúdo de noradrenalina, não foi alterada em músculos EDL de animais hipóxicos (figura 4B).

O possível mecanismo de ativação do sistema proteolítico Ub-proteassoma pelos glicocorticóides em nosso modelo experimental ocorre por meio da ativação transcricional das Ub ligases cuja expressão gênica, como discutido anteriormente, está em condições normais sendo regulada negativamente pela via Akt/FoXO. Há evidências de que estes hormônios reduzem a fosforilação da Akt (LONG et al., 2003; SANDRI et al., 2004), em grande parte, por promover a redução da atividade da PI3K (WANG et al., 2007). A redução da fosforilação da Akt observada em músculos *soleus* de animais expostos à HIA está de acordo com estas evidências e sugere que a inativação da via de sinalização da Akt pelos

glicocorticóides foi o sinal que deflagrou a ativação transcricional das Ub ligases e a consequente hiperatividade do sistema Ub-proteassoma. O fato do mesmo não ter sido observado em músculos EDL pode ser explicado pelo pequeno número de amostras analisadas. Além de promover a desfosforilação da Akt, os glicocorticóides podem também ativar diretamente a transcrição gênica, através da ligação direta do complexo hormônio e seu receptor (GR) em sequências específicas de DNA (GRE: elemento responsivo aos glicocorticóides) nos promotores das Ub ligases. Uma outra possibilidade que pode ser aventada a partir de estudos recentes é que haja uma ativação sinérgica da região promotora dos atrogenes (ex: MuRF1) por FoxO1 e GR (WADDELL et al., 2008).

Embora haja evidências na literatura que indicam a existência de um controle coordenado da atrofia e autofagia no músculo esquelético pela via da Akt/FoXO em diferentes situações catabólicas, nossos dados mostram o contrário. Como pode ser observado na figura.12, a expressão gênica de LC3 e GABARAP, marcadores do processo autofágico, não foram influenciados pela adrenalectomia, o que sugere que a regulação destes genes em nossa condição experimental é independente da ação dos glicocorticóides.

Nossos dados mostram que o aumento da atividade da via dependente de cálcio também foi atenuado pela adrenalectomia em músculos EDL de animais hipóxicos (figura 10), indicando que os glicocorticóides também participam deste efeito proteolítico. Durante a fase aguda de resposta à hipóxia, ocorre um aumento do nível intracelular de cálcio que leva à ativação das calpaínas sensíveis às variações intracelulares deste íon (TOESCU, 2004). Portanto, uma possível explicação é que os glicocorticóides tenham favorecido a entrada de cálcio nas células musculares durante o evento hipóxico levando assim à degradação de proteínas pelo sistema dependente de cálcio. De fato, trabalhos anteriores demonstram uma clara associação entre os glicocorticóides, o influxo de cálcio nas células e a degradação de proteínas em miotúbulos L6 (ITAGAKI et al, 2010) e músculos de ratos (FISCHER et al,

2001). Sendo que em animais sépticos (uma condição de hipóxia intracelular) o tratamento com dantroleno, um inibidor da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, reduz os níveis de corticosterona, previne o influxo muscular de cálcio e a ativação do sistema proteolítico dependente de cálcio em músculos EDL de ratos.

Em conjunto, esses dados mostram que a HIA age como um gatilho catabólico no processo de degradação de proteínas dependente de Ub-proteassoma e cálcio assim como na hiperexpressão de genes relacionados à atrofia e autofagia em músculos esqueléticos de ratos jovens. A ativação do programa atrofico induzida pela HIA parece ser mediada pelos glicocorticóides, via inativação da Akt, sendo esta resposta muito provavelmente importante para o fornecimento de aminoácidos do músculo para o fígado e manutenção da hiperglicemia.

6 CONCLUSÕES

A HIA, durante 8 horas, é uma situação catabólica que resulta em hiperglicemia e aumento da degradação de proteínas dependente de cálcio e Ub-proteassoma em músculos esqueléticos oxidativos (*soleus*) e glicolíticos (EDL) de ratos jovens, sem que haja alteração da síntese proteica.

Nessa condição, a hiperatividade do sistema proteolítico Ub-proteassoma está associada à ativação do processo de ubiquitinação de proteínas miofibrilares e do “programa atrófico”, caracterizado pelo aumento da expressão de genes relacionados à atrofia (Atrogina-1 e MuRF1) e autofagia (LC3 e GABARAP), e redução da capacidade de oxidação de glicose em músculos glicolíticos (EDL) de ratos.

Os glicocorticóides parecem ser os mediadores hormonais responsáveis pela ativação do sistema Ub-proteassoma, dependente de cálcio e de genes relacionados à atrofia (Atrogina-1 e MuRF1) em um evento hipóxico agudo intermitente. Em músculos oxidativos (*soleus*), essa resposta está associada à menor ativação da via de sinalização da Akt.

A hiperativação de genes autofágicos (LC3 e GABARAP) induzidos pela HIA é independente da ação dos glicocorticóides.

Em resumo, esses dados nos permitem sugerir que a ação catabólica mediada pelos glicocorticóides no metabolismo de proteínas musculares, durante uma situação de demanda energética como a HIA, pode ser fundamental para a maior mobilização de aminoácidos do músculo para o fígado, no sentido de favorecer a neoglicogênese e com isso promover o aumento da glicemia plasmática e o fornecimento adequado de energia para os tecidos, especialmente o SNC. Baseados em dados anteriores de nosso laboratório, pode-se também sugerir que a ativação do sistema Ub-proteassoma pode contribuir juntamente com a redução

do processo de síntese para a perda de massa muscular esquelética observada em situações de exposição prolongada à hipóxia intermitente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M de M. **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1232 p.

ARTHUR, P.G.; GILES, J.J.; WAKEFORD, C.M. Protein synthesis during oxygen conformance and severe hypoxia in the mouse muscle cell line C2C12. **Biochim et Biophys Acta**, v. 1475, p. 83-89, 2000.

BAILEY, J.L.; WANG, X.; ENGLAND, B.K.; PRICE, S.R.; DING, X.; MITCH, W.E. The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome pathway. **J Clin Invest**, v. 6, n. 97, p. 1447-53, 1996.

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

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

BEEHLER, B.C.; SLEPH, P.G.; BENMASSAOUD, L.; GROVER, G.J. Reduction of skeletal muscle atrophy by a proteasome inhibitor in a rat model of denervation. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 231, n.3, p. 335-41, 2006.

BERNARD, S.; LEBLANC, P.; WHITTOM, F.; CARRIER, G.; JOBIN, J.; BELLEAU, R.; MALTAIS, F. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 158, n2, p. 629-634, 1998.

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

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

BRAGA, V.A.; SORIANO, R.N.; MACHADO, B.H. Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia. **Exp Physio**, v. 91, n. 6, p. 1025-1031, 2006.

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

CARON, M.A.; THÉRIAULT, M.E.; PARÉ, M.E.; MALTAIS, F.; DEBIGARÉ, R. Hypoxia alters contractile protein homeostasis in L6 myotubes. **FEBS Lett**, v. 583, n. 9, p. 1528-34, 2009.

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.

CHO, J. E.; FOURNIER, M.; DA, X.; LEWIS, M. I. Time course expression of Foxo transcription factors in skeletal muscle following corticosteroid administration. **J Appl Physiol**, v. 108, p. 137–145, 2010.

COMBARET, L.; TAILLANDIER, D.; DARDEVET, D.; BECHET, D.; RALLIERE, C.; CLAUSTRE, A.; GRIZARD, J.; ATTAIX, D. Glucocorticoids regulate mRNA levels for subunits of the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome in fast-twitch skeletal muscles. **Biochem J**, v. 378, p. 239–246, 2004.

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.

DEBIGARE, R.; COTE, C. H.; MALTAIS, F. Peripheral muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. Clinical relevance and mechanisms. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 164, p. 1712–1717, 2001.

DEKHUIJZEN, P.N.; GAYAN-RAMIREZ, G.; BISSCHOP, A.; DE BOCK, V.; DOM, R.; DECRAMER, M. Corticosteroid treatment and nutritional deprivation cause a different pattern of atrophy in rat diaphragm. **J Appl Physiol**, v. 78, p. 629–637, 1995.

FÁBIO, T. L. **Efeitos da hipóxia intermitente crônica no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009. 90p.

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

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

FAUCHER M, GUILLOT C, MARQUESTE T, KIPSON N , MAYET-SORNAY MH, DESPLANCHES D, JAMMES Y AND BADIER M. Matched adaptations of electrophysiological, physiological, and histological properties of skeletal muscles in response to chronic hypoxia. **Pfluegers Arch – Eur J Physiol**, v. 450, p. 45-52, 2005.

FAVIER, F.B.; COSTES, F.; DEFOUR, A.; BONNEFOY, R.; LEFAL, E.; BAUGÉ, S.; PEINNEQUIN, A.; BENOIT, H.; FREYSSENET, D. Downregulation of Akt/mammalian target of rapamycin pathway in skeletal muscle is associated with increased REDD1 expression in response to chronic hypoxia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 6, p. R1659-66, 2010.

FISCHER, D.R.; SUN, X.; WILLIAMS, A.B.; GANG, G.; PRITTS, T.A.; JAMES, J.H.; MOLLOY, M.; FISCHER, J.E.; PAUL, R.J.; HASSELGREN, P.O. Dantrolene reduces serum TNF α and corticosterone levels and muscle calcium, calpain gene expression, and protein breakdown in septic rats. **Shock**, v. 15, n.3, p. 200-207, 2001.

FOURNIER, M.; HUANG, Z.S.; LI, H.; DA, X.; CERCEK, B.; LEWIS, M.I. Insulin-like growth factor-I prevents corticosteroid-induced diaphragm muscle atrophy in emphysematous hamsters. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 285, p. R34–R43, 2003.

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.

FUJIMOTO, Y.W. The Importance of Insulin Resistance in the Pathogenesis of type 2 diabetes Mellitus. **Am J Med**, v.108, n.6A, p.9S-14S, 2000.

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**, n. 60, v.3, p. 206-208, 1996.

GLASS, D.J. Signaling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **Nature**, 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.

GOLDBERG, A. L.; TISCHLER, M.; DEMARTINO, G.; GRIFFIN, G. Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle. **Fed Pro**, v. 39, p. 31–36, 1980.

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.; DAYTONN, W.R.; SINGH, I.; ROBSON, R.M. Studies of the α -actinin/actin interaction in the Z-disc by using calpain. **J Biol Chem**, v. 266, p. 8501-851, 1991.

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

GOODMAN, C.A.; MAYHEW, D.L.; HORNBERGER, T.A.; Recent progress toward understanding the molecular mechanisms that regulate skeletal muscle mass. **Cell Signalling**, v. 23, p. 1896–1906, 2011.

GRAÇA, F. A. **A ação fisiológica da adrenalina na regulação do metabolismo de proteínas musculares no jejum**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010. 75p.

GUYTON AC, HALL JE. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002. 973 p.

HASSELGREN, P. O. Glucocorticoids and muscle catabolism. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 2, p. 201–205, 1999.

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

HOCHACHKA, P.W.; BUCK, L.T.; DOLL, C.J.; LAND, S.C. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 9493-9498, 1996.

HOCKEL, M.; VAUPEL, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biological, and molecular aspects. **J Natl Cancer Inst**, v. 93, p. 266-276, 2001.

HOFFMAN, E.;P.; NADER, G.A. Balancing muscle hypertrophy and atrophy. **Nature Med**, v. 10, p. 584-485, 2004.

HOPPELER, H.; KLEINERT, E.; SCHLEGEL, C.; CLAASSEN, H.; HOWALD, H.; KAYAR, S.R.; CERRETELLI, P. Morphological adaptations of human skeletal muscle to chronic hypoxia. **Int J Sports Med**, v. 11, p. S3-S9, 1990.

HU, Z.; WANG, H.; LEE, I.H.; DU, J.; MITCH, W.E. Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice. **J Clin Invest**, v. 119, n. 10, p. 3059-3069, 2009.

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.

ITAGAKI, K.; MENCONI, M.; ANTONIU, B.; ZHANG, Q.; GONNELLA, P.; SOYBEL, D.; HAUSER, C.; HASSELGREN, P.O. Dexamethasone stimulates store-operated calcium entry and protein degradation in cultured L6 myotubes through a phospholipase A(2)-dependent mechanism. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 298, n.5, p. C1127-1139, 2010.

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

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

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

KETTELHUT, I.C.; PEPATO, M.T.; MIGLIORINI, R.H.; MEDINA, R.; GOLDBERG, A.L. Regulation of different proteolytic pathways in skeletal muscle in fasting and diabetes mellitus. **Braz J Med Biol Res**, v. 4, n. 27, p. 981-93. 1994.

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

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.

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

KRAWIEC, B.J.; FROST, R.A.; VARY, T.C.; JEFFERSON, L.S.; LANG, C.H. Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 289, p. 969-980, 2005.

LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L.; MITCH, W. E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, p. 1807-1819, 2006.

LECKER, S.H.; JAGOE, R.T.; GILBERT, A.; GOMES, M.; BARACOS, V.; BAILEY, J.; PRICE, S.R.; MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **FASEB J**, v. 18, p. 39-51, 2004.

LECKER, S. H.; SOLOMON, V.; MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin- proteasome pathway in normal and disease states. **J Nutr**, v. 129, p. 227S-237S, 1999.

LEE, R.C.; WANG, Z.; HEO, M.; ROSS, R.; JANSSEN, I.; HEYMSFIELD, S.B. Total-body skeletal muscle mass: development and cross-validation of anthropometric prediction models. **Am J Clin Nutr**, v.72, p. 796-803, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo, Sarvier, 2002. 975p.

LEI, K.J.; CHEN, H.; PAN, C.J.; WARD, J.M.; MOSINGER, J.R.B.; LEE, E.J.; WESTPHAL, H.; MANSFIELD, B.C.; CHOU, J.Y. Glucose-6-phosphatase dependent substrate transport in the glycogen storage disease type-1a mouse. **Nat Genet**, v. 13, p. 203-209, 1996.

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

LIGHTMAN, S.L.; CONWAY-CAMPBELL, B. L. The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. **Nat Rev Neurosci.**, v. 11, p. 710-718, 2010.

LIU, Z.; LI, G.; KIMBALL, S. R.; JAHN, L. A.; BARRETT, E. J. Glucocorticoids modulate amino acid-induced translation initiation in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 287, p. E275–E281, 2004.

LIYORI, N.; ALONSO, L.C.; LI, J.; SANDERS, M.H.; GARCIA-OCANA, A.; O'DOHERTY, R.M.; POLOTSKY, V.Y.; O'DONNELL, C.P. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. **Am J Resp Crit Care Med**, v. 175, p.851-857. 2007.

LIZUKA K, KAWAGUCHI H, YASUDA H, KITABATAKE A. The role of calcium activated neutral protease on myocardial cell injury in hypoxia. **Jpn Heart J**, v. 33, n. 5, p. 707-15, 1992.

LOFBERG, E.; GUTIERREZ, A.; WERNERMAN, J.; ANDERSTAM, B.; MITCH, W. E.; PRICE, S. R.; BERGSTROM, J.; ALVESTRAND, A. Effects of high doses of glucocorticoids on free amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. **Eur J Clin Invest**, v. 32, p. 345–353, 2002.

LONG, W.; BARRETT, E.J.; WEI, L.; LIU, Z. Adrenalectomy enhances the insulin sensitivity of muscle protein synthesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 284, p. E102–E109, 2003.

LÓPEZ-BARNEO, J.; PARDAL, R.; ORTEGA-SAENZ, P. Cellular mechanism of oxygen sensing. **Annu Rev Physiol**, v. 63, p. 259–287, 2001.

LOUIS, M.; PUNJABI, N.M. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. **J Appl Physiol**, v.106, n.5, p.1538-44, 2009.

MANCHESTER, K. L.; YOUNG, F. G. Hormones and protein biosynthesis in isolated rat diaphragm. **J Endocrinol**, v. 18, p. 381-94, 1959.

MARINOVIC, A. C.; ZHENG, B.; MITCH, W. E.; PRICE, S. R. Ubiquitin (UbC) expression in muscle cells is increased by glucocorticoids through a mechanism involving Sp1 and MEK1. **J Biol Chem**, v. 277, p. 16673–16681, 2002.

MEDINA, R.; WING, S.S.; HAAS, A.; GOLDBERG, A.L. Activation of the ubiquitin-ATP-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting and denervation atrophy. **Biomed Biochim Acta**, v. 50, p. 347-56, 1991.

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.

MICHIELS C. Physiological and pathological responses to hypoxia. **Am J Pathol**, v. 164, p. 1875–1882, 2004.

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

MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. **Engl J Med**, v. 335, p. 1897–1905, 1996.

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

MORRISON, W.L.; GIBSON, J.N.; SCRIMGEOUR, C.; RENNIE, M.J. Muscle wasting in emphysema. **Clin Sci**, v. 75, p. 415-420, 1988.

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

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

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

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

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

NIETO, F.J.; YOUNG, T.B.; LIND, B.K.; SHAHAR, E.; SAMET, J.M.; REDLINE, S.; D'AGOSTINO, R.B.; NEWMAN, A.B.; LEBOWITZ, M.D.; PICKERING, T.G. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. **JAMA**, v.14, n. 283, p. 1829-1836, 2000.

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

OGATA, T.; OISHI, Y.; HIGUCHI, M.; MURAOKA, I. Fasting-related autophagic response in slow- and fast-twitch skeletal muscle. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 395, p. 136-140, 2010.

OHSUMI, Y. Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, p. 211-216, 2001.

PALMA, S.; RIPAMONTI, M.; VIGANO, A.; MORIGGI, M.; CAPITANIO, D.; SAMAJA, M.; MILANO, G.; CERRETELLI, P.; WAIT, R.; GELFI, C. Metabolic modulation induced by chronic hypoxia in rats using a comparative proteomic analysis of skeletal muscle tissue. **J Prot Re**, v. 6, p. 1974-1984. 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.264, p. E340-E347, 1996.

PESSIN, E.J.; SALTIEL, R.A. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance., **J Clin Invest**, v.106, n.2, 2000.

PETTERSEN, E. O.; JUUL, N. O.; RUNNING, O. W. Regulation of Protein Metabolism of Human Cells during and after Acute Hypoxia. **Can Res**, V. 46, P. 4346-4351, 1986.

PETERSEN F.K.; SHULMAN, I.G. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **Am J Cardiol**, v.90, n. 5, p. 11G-18G, 2002.

PRABHAKAR, N. R.; KUMAR, G. K. Oxidative stress in the systemic and cellular responses to intermittent hypoxia. **Biol Chem**, v. 385, p. 217-221, 2004.

PREEDY, V. R.; SUGDEN, P. H. The effects of fasting or hypoxia on rates of protein synthesis *in vivo* in subcellular fractions of rat heart and gastrocnemius muscle. **Biochem J**, v. 257, p. 519-527, 1989.

PRICE, S. R.; ENGLAND, B. K.; BAILEY, J. L.; VAN VREEDE, K.; MITCH, W. E. Acidosis and glucocorticoids concomitantly increase ubiquitin and proteasome subunit mRNA levels in rat muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 267, p. C955–C960, 1994.

PUIGSERVER, P.; RHEE, J.; DONOVAN, J.; WALKEY, C.J.; YOON, J.C.; ORIENTE, F.; KITAMURA, Y.; ALTOMONTE, J.; DONG, H.; ACCILI, D.; SPIEGELMAN, B.M. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1alpha interaction. **Nature**, v. 423, p. 550–555, 2003.

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.

REINKE, C.; BEVANS-FONTI, S.; DRAGER, L.F.; SHIN, M.K.; POLOTSKY, V.Y. Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. **J Appl Physiol**, v. 111, n.3, 881-90, 2011.

RUSSELL, S.T.; SIREN, P.M.; SIREN, M.J.; TISDALE; M.J. Attenuation of skeletal muscle atrophy in cancer cachexia by D-myo-inositol 1,2,6-triphosphate. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 3, n. 64, p. 517-527, 2009.

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

SAIDO HC, SORIMACHI H, AND SUZUKI K.Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. **FASEB J**, v. 8, n.11, p. 814-822, 1994.

SALTIEL, A.R. New perspectives into the molecular Pathogenesis and Treatment of type 2 Diabetes. **Cell**, v.104, n.4, p.517-529, 2001.

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

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

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.

SCHAKMAN, O.; GILSON, H.; THISSEN, J. P. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. **J Endocrinol**, v. 197, p. 1-10, 2008.

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

SHAHAR, E.; WHITNEY, C.W.; REDLINE, S.; LEE, E.T.; NEWMAN, A.B.; JAVIER NIETO, F.; O'CONNOR, G.T.; BOLAND, L.L.; SCHWARTZ, J.E.; SAMET, J.M. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 163, n.1, p.19-25, 2001.

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

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

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

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

TE PAS, M. F.; DE JONG, P. R.; VERBURG, F. J. Glucocorticoid inhibition of C2C12 proliferation rate and differentiation capacity in relation to mRNA levels of the MRF gene family. **Mol Biol Reports**, v. 27, p. 87–98, 2000.

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

TOESCU, E.C. Hypoxia sensing and pathways of cytosolic Ca²⁺ increases. **Cell Calcium**, v. 36, p. 187-99, 2004.

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.

WADDELL, D.S.; BAEHR, L.M.; VAN DEN BRANDT, J.; JOHNSEN, S.A.; REICHARDT, H.M.; FURLOW, J.D.; BODINE, S.C. The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, p. E785–E797, 2008.

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

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

WING, S.S. The UPS in diabetes and obesity. **BMC Biochem**, v. 9, n. S1, p. 2091-2099, 2008.

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

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

WINDLE, R.J.; WOOD, S.A.; LIGHTMAN, S.L.; INGRAM, C.D. The pulsatile characteristics of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses. **Endocrinology**, v. 139, p. 4044-4052, 1998.

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.

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

YOKOE, T.; ALONSO, L.C.; ROMANO, L.C.; ROSA, T.C.; O'DOHERTY, R.M.; GARCIA-OCANA, A.; MINOGUCHI, K.; O'DONNELL, C.P. Intermittent hypoxia reverses the diurnal glucose rhythm and causes pancreatic beta-cell replication in mice. **J Physiol**, v. 586, n.3, p. 899-911, 2008.

YOUNG, E.A.; ABELSON, J.; LIGHTMAN, S.L. Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. **Front Neuroendocrinol**, v. 25, p. 69- 76, 2004.

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 utophagic/lysosomal and proteassomal pathways in atrophying muscle cells. **Cell Metabolism**, v. 6, p. 472-483, 2007.