

Eduardo Carvalho Lira

Efeito Anticatabólico dos Derivados de Xantina
no Metabolismo de Proteínas em Músculo
Esquelético de Ratos Sépticos: Um Estudo de
Microdiálise

São José do Rio Preto
2006

Eduardo Carvalho Lira

Efeito Anticatabólico dos Derivados de Xantina no
Metabolismo de Proteínas em Músculo Esquelético
de Ratos Sépticos: Um Estudo de Microdiálise

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto
para obtenção do Título de Mestre no
Curso de Pós Graduação em Ciências
da Saúde, Eixo Temático: Medicina e
Ciências Correlatas.

Orientador: Prof.Dr. Luiz Carlos C. Navegantes

São José do Rio Preto
2006

Lira, Eduardo Carvalho

Efeito anticatabólico dos derivados de xantina no metabolismo de proteínas na musculatura esquelética de ratos sépticos: um estudo de microdiálise / Eduardo Carvalho Lira.

São José do Rio Preto, 2006.
72 p.; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

1.Xantinas; 2.Microdiálise; 3.Músculo Esquelético; 4.Proteólise; 5.Sepse

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimento especial.....	ii
Agradecimentos.....	iv
Epígrafe.....	v
Lista de figuras.....	vi
Lista de tabela.....	viii
Lista de abreviaturas e siglas.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Microdiálise.....	3
1.2. Metilxantinas.....	6
1.3. Sepses.....	8
1.3.1. Fisiopatologia.....	8
1.3.2. Sepses Experimentais.....	9
1.4. Objetivos.....	10
2. Materiais e métodos.....	12
2.1. Animais.....	13
2.2. Estudo do metabolismo de proteínas pela técnica de microdiálise.....	13
2.2.1. Microdiálise: procedimento geral.....	13

2.2.2. Determinação do fator de recuperação (“recovery”) dos cateteres.....	15
2.2.3. Cálculos para determinação da concentração intersticial de tirosina.....	16
2.3. Padronização da técnica de microdiálise.....	17
2.4. Padronização do modelo de sepse experimental.....	18
2.4.1. Indução da sepse pela ligadura e punção do ceco (CLP).....	18
2.4.2. Avaliação de parâmetros metabólicos.....	19
2.5. Estudo do metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos sépticos pela microdiálise.....	20
2.6. Determinação dos parâmetros hemodinâmicos.....	22
2.6.1. Pressão arterial média (PAM).....	22
2.6.2. Quantificação do fluxo sangüíneo muscular (FSM).....	22
2.7. Efeitos sistêmicos da pentoxifilina (PTX) no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos.....	23
2.8. Efeitos <i>in situ</i> da pentoxifilina (PTX) e da 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) no metabolismo de proteínas no músculo esquelético de ratos.....	24
2.9. Procedimento experimental para o estudo da proteólise <i>in vitro</i> em músculos esqueléticos de ratos.....	25
2.9.1. Avaliação da atividade proteolítica.....	26
2.10. Análise histológica.....	26
2.11. Análise bioquímica.....	28
2.11. Análise Estatística.....	29
3. Resultados.....	30
3.1. Concentração intersticial de tirosina em músculos esqueléticos de ratos normais.....	31

3.2. Efeito da sepse experimental induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP).....	32
3.2.1. Características dos animais.....	32
3.2.2. Efeito nos parâmetros metabólicos.....	33
3.2.3. Efeito no metabolismo de proteínas na musculatura esquelética de ratos.....	34
3.2.4. Efeito nos parâmetros hemodinâmicos.....	34
3.2.5. Efeitos na histologia dos músculos esqueléticos.....	38
3.3. Efeito sistêmico da pentoxifilina (PTX) no metabolismo de proteínas e na hemodinâmica de ratos sham e sépticos.....	40
3.4. Efeitos da perfusão <i>in situ</i> com os derivados de xantina no metabolismo de proteínas e no fluxo sanguíneo muscular (FSM) de ratos sham e sépticos.....	42
3.5. Efeito <i>in vitro</i> da 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) na degradação de proteínas em músculos de ratos sham e sépticos.....	45
4. Discussão.....	47
5. Conclusões.....	61
6. Referências bibliográficas.....	63

A Deus por Seu amor e Sua paternidade incondicional;

A meus pais Francisco Roberci Teixeira Lira e Maria Luiza Medeiros Lira, os quais ao meu lado sempre estiveram, velando-me desde os primeiros passos e conduzindo-me na existência, ensinando-me valores de respeito ao próximo e a mim mesmo, além do incentivo indispensável e a corrigenda necessária;

*As minhas irmãs Maria Suelly (*in memoriam*) e Maria Sonaly, cuja convivência harmoniosa me ensinaram o valor da fraternidade;*

Ao meu irmão Elson pela dedicada e imensurável amizade;

Ao meu primo-irmão Felipe Nollet pelo carinho e companheirismo;

Aos meus sobrinhos Antônio Roberci, Lívia, André, Artur Ricardo, João Victor e Elza Luiza que nos sorrisos da infância me ensinaram a simplicidade de viver;

*Aos meus avós Severino e Maria José Teixeira Lira (*in memoriam*) e a minha tia Luzia Maria Teixeira Lira, cujo significado na minha vida é comparável ao de pai e mãe.*

Ao amigo Luiz Carlos C. Navegantes pelas lições diárias de humanidade, companheirismo, ética e humildade. Também ao Prof.Dr.Luiz Carlos Carvalho Navegantes pelo zelo e esforço na minha formação acadêmica, sempre com muito respeito e bom senso;

A Profa. Dra. Ísis do Carmo Kettelhut que me permitiu conhecer a pesquisa em fisiologia no curso de verão de fisiologia em 2002. Também pelo carinho e atenção que me dedicou nas oportunidades que tive sua gentil e inesquecível convivência;

A amiga-irmã Janaína Silva de Freitas pelo respeito, dedicação e amor, sentimentos que sempre nortearam nossa amizade;

As amigas Glória Elisa Florido Mendes e Sandra Mara de Oliveira pelas lições cotidianas e agradáveis conversas, das quais sempre extraí aprendizado para vida;

Aos amigos Flávia Aparecida Graça e Dawit Albieiro Gonçalves pelo aprendizado diário e o apoio irrestrito durante minha permanência no laboratório de endocrinologia e metabolismo;

Aos amigos e colaboradores do laboratório de controle hormonal, neural e nutricional do metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), especialmente a Neusa Resano e Amanda Baviera pelo carinho e boa vontade com que sempre me trataram, além do exemplo de dedicação e empenho profissional;

Aos amigos Reinaldo Macari, Érico Vinícius, Livia Poli e Rafael Panizza pela convivência e auxílio diários;

A dona Sônia Graça por todo carinho e sincera amizade, além do fraterno abraço do qual jamais me esquecerei;

À Profa.Dra. Orfa Alonso pelas agradáveis conversas;

A Profa.Dra. Elza Castilho pelas oportunidades oferecidas com simplicidade e carinho;

Aos amigos Ricardo Nardin, Andrea Mendicino, Marisa Balura e todos aqueles que compõem o Grupo Espírita Irmãos de Luz pelo apoio sincero e fraterno ao longo de minha permanência em São José do Rio Preto.

Enfim, a vida por suas belezas e encantos que permitem crescer.

- ✓ À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP pela oportunidade da concretização deste sonho.
- ✓ Ao Prof.Dr.Emmanuel Burdmann pelo apoio dado ao longo de minha permanência na Famerp;
- ✓ Aos amigos do laboratório de fisiopatologia renal;
- ✓ Aos funcionários do biotério da Famerp, cuja convivência foi sempre tão prazerosa, especialmente sr.Walter, dona Luzia, Pedro, Dala e Edna.
- ✓ Ao sr. Bizutti pela agradável convivência e colaboração;
- ✓ Aos colegas de pós-graduação, especialmente Adriana Barbosa, Alessandra Vidotto, Gisele Martins, Adriano Mondini, Angelita Carniel e Juliana Cintra.
- ✓ Aos amigos Rodrigo Porto, Rodrigo Imperial e Ana Paula pelo carinho e apoio;
- ✓ Aos colegas e aos membros da pós-graduação, especialmente ao José Antonio, Fabiana, Guilherme e Rose;
- ✓ A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para minha formação acadêmica;
- ✓ A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (04/02674-0) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*“Ninguém detém a verdade, pois
ela está no devir do diálogo.”*

(Paulo Freire)

Figura 1	Figura 1: Desenho esquemático de um cateter linear (A). O cateter pode ser facilmente inserido no músculo esquelético com a ajuda de uma cânula-guia e conectado à bomba de microperfusão (B).....	15
Figura 2	Protocolo experimental utilizado para a determinação da concentração intersticial de tirosina no músculo tibial anterior de ratos normais.....	18
Figura 3	Protocolo experimental utilizado para o estudo dos efeitos da sepse de 3 horas no metabolismo de proteínas na musculatura esquelética de ratos pela microdiálise.....	20
Figura 4	Protocolo experimental utilizado para o estudo dos efeitos da sepse de 6 e 10 horas no metabolismo de proteínas na musculatura esquelética de ratos pela microdiálise.....	21
Figura 5	Protocolo experimental utilizado para o estudo dos efeitos do tratamento sistêmico com pentoxifilina (PTX; 50mg/Kg e.v.) no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos sépticos de 3 horas.....	24
Figura 6	Concentrações intersticial (I), arterial (A) e diferença I – A de tirosina em músculos de ratos (A). Fator de recuperação ou “ <i>recovery</i> ” dos cateteres de microdiálise (B).....	32
Figura 7	Efeito da sepse experimental induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP) nas concentrações intersticial (A), arterial (B) e diferença I – A (C) de tirosina após 3, 6 e 10 horas da cirurgia.....	36
Figura 8	Efeito da sepse experimental induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP) na pressão arterial média (PAM) após 3 (A), 6 (B) e 10 horas (C) da	

	cirurgia.....	37
Figura 9	Efeito da sepse experimental induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP) na extração fracional de etanol no músculo tibial anterior de ratos após 3 h da cirurgia.....	38
Figura 10	Análise histológica de músculo tibial anterior de ratos sham (A, C e E) e sépticos (B, D e F) após três horas de cirurgia.....	39
Figura 11	Efeito do tratamento com PTX (50mg/Kg, e.v.) nas concentrações intersticial (I), arterial (A) e diferença I – A de ratos sham (A) e sépticos (B).....	40
Figura 12	Efeito do tratamento com pentoxifilina (PTX; 50mg/Kg, e.v.) na pressão arterial média (PAM) de ratos sham (A) e sépticos (B).....	41
Figura 13	Efeito do tratamento com PTX (50mg/Kg, e.v.) na extração fracional de etanol no músculo de ratos sham e sépticos.....	42
Figura 14	Efeito <i>in situ</i> da PTX (1mM) nas concentrações intersticial (I), arterial (A) e diferença I – A de ratos sham (A) e sépticos (B).....	43
Figura 15	Efeito <i>in situ</i> da IBMX (1mM) nas concentrações intersticial (I), arterial (A) e diferença I – A de ratos sham (A) e sépticos (B).....	44
Figura 16	Efeito <i>in situ</i> da PTX (1mM) na extração fracional de etanol em músculo de ratos sham (A) e sépticos (B).....	44
Figura 17	Efeito da <i>in situ</i> de IBMX (1mM) na extração fracional de etanol em músculos de ratos sham (A) e sépticos (B).....	45
Figura 18	Efeito da sepse experimental após 3 horas e da IBMX (1mM) <i>in vitro</i> na degradação total de proteínas musculares.....	46

Tabela 1	Efeito da sepse experimental induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP) nas concentrações plasmáticas de uréia, glicose e lactato, no conteúdo de glicogênio hepático e muscular, pH, pressões parciais de oxigênio e dióxido de carbono, hematócrito, bicarbonato e excesso de base após 3 horas da cirurgia.....	35
----------	---	----

[EtD]	Concentração de etanol no dialisado.
[EtSP]	Concentração de etanol na solução de perfusão.
[tyr] arterial	Concentração no plasma arterial de tirosina.
[tyr] interstício	Concentração intersticial de tirosina.
°C	Grau centígrado.
ANOVA	Análise de variância.
ATP	Adenosina trifosfato.
EB	Excesso de base.
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico.
CLP	Ligadura e punção do ceco.
D	Dialisado.
DPM	Decaimento por minutos.
e.v.	Endovenoso.
EDL	Extensor digital longo.
EF	Extração fracional.
EP	Erro padrão.
FR	Fator de recuperação.
FSM	Fluxo sanguíneo muscular.
HCO ³⁻	Bicarbonato.
i.p.	Intraperitoneal.
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina.
Il	Interleucinas.
KDa	Quilodalton.
KOH	Hidróxido de potássio.
LPS	Lipopolissacarídeo.
mg/Kg	Miligramas por quilograma.
ml	Mililitro.
mg/dL	Miligramas por decilitro.
mm	Milímetro.
mmHg	Milímetros de mercúrio.
mM/l	Milimol por litro.

mmol/ml	Milimol por mililitro.
N	Concentração normal.
nmol/ml	Nanomol por mililitro.
PAM	Pressão arterial média.
PCA	Ácido perclórico.
PCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono.
PE	Polietileno.
pH	Potencial hidrogeniônico.
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio.
PTX	Pentoxifilina.
s.c.	Subcutâneo.
SNC	Sistema nervoso central.
SP	Solução de perfusão.
TCA	Ácido tricloroacético.
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa.
μ l/min	Microlitro por minuto.
μ M	Micromolar.
HE	Hematoxilina-eosina.
¹⁴ C	Carbono 14.
³ H	Trício.
NaCl	Cloreto de sódio.
%	percentual

Objetivo: investigar o efeito anticatabólico dos derivados de xantinas no metabolismo de proteínas de ratos sépticos utilizando a técnica de microdiálise. Materiais e métodos: Ratos machos Wistar (~250g) foram anestesiados com tiopental (50mg/Kg, i.p.) e mantidos em mesa cirúrgica aquecida (37°C). A sepse foi induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP) e os músculos estudados após 3, 6 e 10 horas da cirurgia. O cateter de microdiálise foi inserido no tibial anterior, o qual foi perfundido a um fluxo constante de 1,0µl/min com solução salina enriquecida com albumina bovina (0,5%), 50 µM de tirosina fria, 1 mmol/l de glicose e [¹⁴C]-tirosina. A tirosina foi quantificada por fluorescência no dialisado, sangue arterial e solução de perfusão, após 90 minutos de microdiálise. O cateter foi calibrado *in situ* pela técnica da referencia interna. O Fluxo Sanguíneo Muscular (FSM) foi avaliado pela técnica do *clearance* de etanol. A proteólise foi quantificada no *extensor digitorus longus* (EDL) de ratos (~70g) sham ou sépticos por meio da liberação de tirosina *in vitro*. Resultados: A concentração intersticial de tirosina foi sempre maior que a concentração arterial. A sepse de 3 horas reduziu em 33% o FSM e aumentou em 127% a concentração intersticial de tirosina (235 ± 16, n=10) em relação ao sham (95 ± 5, n=10). A diferença I-A também foi maior no grupo séptico (117 ± 16 vs. 31 ± 6 no sham, n=10). A infusão sistêmica da pentoxifilina (PTX; 50mg/Kg, e.v.), durante a primeira hora pós-CLP, reduziu em 25% e 50% a concentração intersticial e a diferença I-A de tirosina, respectivamente. O tratamento *in situ* com isobutil-metil-xantina (IBMX; 1mM), mas não com PTX, reduziu a concentração intersticial (30-46%) e a diferença I-A (43-48%) de tirosina, em ambos os grupos. O aumento da proteólise muscular induzido pela sepse foi abolido pela ação *in vitro* da IBMX (1mM) que reduziu a proteólise em 41%. Conclusões: os resultados mostram que: (1) a microdiálise é uma técnica perfeitamente adaptada ao

estudo do metabolismo de proteínas em situações catabólicas; (2) o modelo da CLP de 3 horas ativa o catabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos; (3) As ações sistêmicas, *in situ* e *in vitro* dos derivados de xantinas reduzem o catabolismo de proteínas em músculos de ratos sépticos.

1. Xantinas; 2. Microdiálise; 3. Músculo esquelético; 4. Proteólise; 5. Sepses.

Introduction: The aim of the present study was to estimate the anticatabolic effect of xanthine derivatives on skeletal muscle protein metabolism from septic rats by using microdialysis. **Methods:** Sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP). After 3, 6 and 10 hours of surgery, male Wistar rats (~250g) were anesthetized with thionembutal sodium (50mg/Kg body weight i.p.) and placed on heating pads to maintain adequate temperature (37°C). Microdialysis probe was inserted in the anterior tibial muscle and an equilibration period of 30 minutes was allowed. After connecting the catheter inlet to a microinjection pump, the system was perfused with 0,5% bovine serum albumin, 50 µM tyrosine and 1 mmol/l glucose in isotonic saline at a rate of 1.0 µl/min. Samples of the skeletal muscle interstitial fluid and arterial plasma from carotid artery were collected after 90 minutes of experiment and tyrosine was measured by fluorescence. The interstitial tyrosine concentration was estimated from the dialysate concentration. To calibrate catheters *in vivo* the internal reference calibration technique was used. The muscle blood flow was estimated by ethanol technique. Overall proteolysis was investigated in *extensor digitorus longus* (EDL) muscles from sham-operated and 3-hour septic rats (~70g) incubated in the presence or not of IBMX (1mM). **Results:** In sham-operated and septic rats, skeletal muscle interstitial tyrosine levels (µM) were significantly higher than arterial plasma tyrosine. Three-hour septic rats showed a 33% decrease in muscle blood flow and a 128% increase in the concentration of tyrosine in skeletal muscle interstitial (235 ± 16 , n=10), when compared to sham-operated rats ($95,5 \pm 5,5$, n=10). Interstitial (I) minus arterial (A) plasma tyrosine concentrations difference was also significantly increased after 3 hours of sepsis (117 ± 7 vs. 31 ± 6 in sham-operated, n=10). Pentoxifylline (PTX; 50mg/Kg body weigh, e.v.) treatment, during 1 hour immediately after CLP, reduced in 25% and

50% the interstitial tyrosine concentration and I-A difference, respectively. *In situ* isobutylmethylxanthine (IBMX; 1mM), but not PTX, reduced the interstitial tyrosine concentration (30-46%) and I-A difference (43-48%) in both groups. The increase of proteolysis induced by sepsis in EDL muscles was abolished by *in vitro* addition of IBMX (1mM). Conclusions: The data show that: (1) microdialysis is a perfectly adapted tool to investigate *in vivo* regulation of muscle protein metabolism during acute catabolic states; (2) the catabolic effect of sepsis on rat skeletal muscle protein metabolism *in vivo* can be observed 3 hours after CLP; (3) the xanthine derivatives reduce the muscle protein catabolism induced by sepsis in rats.

1. Xanthines; 2. Microdialysis; 3. Skeletal muscle; 4. Proteolysis; 5. Sepsis.

1. Introdução.

A musculatura esquelética constitui cerca de 45% do peso corporal, sendo um tecido indispensável à homeostase metabólica corporal ^(1,2). As proteínas musculares estão continuamente sendo renovadas, obedecendo a um ciclo de síntese e degradação cuidadosamente regulado por fatores nutricionais, neurais e hormonais ^(2,3). Atualmente, sabe-se que o controle da degradação de proteínas é de extrema importância na regulação do ciclo celular, na reciclagem de proteínas anormais, no fornecimento de aminoácidos para a neoglicogênese, na regulação das concentrações enzimáticas, na apresentação de antígenos de superfície nas respostas imunes, etc. ^(3,4) Todas estas funções demonstram a importância da investigação da regulação do *turnover* de proteínas em situações normais e catabólicas.

A regulação da proteólise intracelular não envolve somente o sistema proteolítico lisossomal. Hoje, sabe-se da existência de pelo menos duas outras vias de degradação de proteínas com suas respectivas proteases: a via proteolítica dependente de cálcio e a dependente de ATP-ubiquitina-proteassoma. A ativação destes processos proteolíticos é o principal mecanismo fisiopatológico responsável pela perda de massa muscular que ocorre em diferentes situações catabólicas como a sepse, o câncer, a insuficiência renal crônica, o diabetes *mellitus*, etc. Por esta razão, essas proteases musculares podem representar importantes alvos de intervenções terapêuticas que tenham como objetivo reduzir a atrofia muscular ^(5,6).

Grandes avanços no conhecimento dos mecanismos intracelulares do metabolismo de proteínas foram obtidos a partir de preparações de músculos esqueléticos mantidos *in vitro* ⁽³⁾. Nessas preparações utilizam-se músculos isolados de

pequenos roedores (com peso máximo de 70g) que possibilitam a difusão adequada de oxigênio e nutrientes no tecido incubado. No entanto, ainda há uma grande limitação metodológica na investigação do balanço protéico em músculos esqueléticos de animais adultos e em situações *in vivo*. Por exemplo, as medidas *in vivo* dos processos de síntese e degradação das proteínas musculares, realizadas com isótopos estáveis em humanos estão sujeitas a um grande número de artefatos e têm freqüentemente gerado controvérsia. A utilização de biópsias de músculos também tem sido limitada pela natureza traumática do procedimento e pela impossibilidade da coleta de amostras seriadas ⁽⁷⁾. Considerando essas dificuldades metodológicas, propomos nesse trabalho a utilização de uma nova metodologia para a investigação *in situ* do metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos adultos: a microdiálise.

1.1. Microdiálise.

A microdiálise é uma técnica que foi desenvolvida, inicialmente, para o estudo de neurotransmissores no Sistema Nervoso Central (SNC) de animais ⁽⁸⁾. Bito *et al.* ⁽⁹⁾ foram os primeiros a implantar cirurgicamente “sacos de diálise” no hemisfério cerebral de cães para determinar o conteúdo de aminoácidos. Nestes estudos pioneiros introduziu-se, pela primeira vez, o conceito de que um compartimento circundado por uma membrana semipermeável seria capaz de estabelecer um equilíbrio de concentração com o fluido extracelular e, portanto, poderia ser utilizado para a análise contínua de diferentes substâncias contidas neste fluido. No início dos anos 80, com o desenvolvimento de novos cateteres, a microdiálise passou a ser utilizada para o estudo do controle do metabolismo intermediário em diferentes órgãos e tecidos periféricos de

animais e humanos como o tecido adiposo subcutâneo, o músculo esquelético, o fígado, etc ^(10,11).

O princípio da microdiálise é extremamente simples: baseia-se na difusão de substâncias hidrossolúveis através de uma membrana de diálise. Moléculas hidrossolúveis como a glicose, o glicerol, o lactato e os aminoácidos, os quais estão presentes no espaço intersticial, difundem-se em favor de seu gradiente de concentração para dentro do cateter de diálise. Por outro lado, substâncias que tenham sido adicionadas ao perfusado se difundem no sentido oposto para dentro do espaço intersticial exercendo seus efeitos diretamente na superfície celular ^(12,13).

Entre as vantagens da microdiálise, podemos citar: (I) a sua grande aplicabilidade na investigação clínica e experimental; (II) a determinação contínua por horas ou até mesmo dias da concentração de uma determinada substância no espaço intersticial de um órgão ou tecido; (III) a determinação em uma única amostra de diferentes metabólitos; (IV) e do fluxo sanguíneo local; (V) a determinação dos efeitos farmacológicos de diferentes hormônios, drogas ou componentes metabolicamente ativos presentes no perfusado, os quais podem ser precisamente estudados, sem efeitos colaterais sistêmicos; (VI) o baixo custo e (VII) a análise de pequenos volumes de amostras, sem necessidade de purificação ^(12,14). No entanto, a principal desvantagem dessa técnica é a possibilidade da interpretação errônea dos resultados. Tem sido demonstrado que alterações hemodinâmicas da microvasculatura de diferentes tecidos, incluindo o muscular, podem influenciar a concentração intersticial de várias moléculas ^(13,15). É sabido que a ação *in situ* de drogas vasodilatadoras elevam o *clearance* de substâncias que são liberadas pela célula, como por exemplo, a tirosina pelo músculo, reduzindo a sua concentração no interstício ⁽¹⁵⁾. O oposto pode ocorrer em situações de

redução do fluxo. Estes efeitos podem ser atribuídos a efeitos celulares, mas são, de fato, resultantes de alterações locais do fluxo sanguíneo. Assim, um parâmetro fundamental nos experimentos de microdiálise é a determinação simultânea da concentração intersticial do metabólito e do fluxo sanguíneo do tecido perfundido ^(13,15).

Com o aprimoramento da utilização da microdiálise em tecidos periféricos tornou-se possível a quantificação da concentração intersticial de aminoácidos no músculo esquelético e cardíaco ^(7,13,16). A análise dos aminoácidos no interstício muscular permite o estudo *in situ* do metabolismo de proteínas e pode fornecer uma série de informações adicionais sobre a fisiologia e fisiopatologia do tecido muscular. Em estudos *in vitro* a tirosina tem sido o aminoácido preferencialmente utilizado para a avaliação da velocidade de degradação das proteínas, porque além de não ser sintetizado “de novo” e degradado pela fibra muscular, é facilmente mensurável pela utilização de um método fluorimétrico de grande sensibilidade, reprodutibilidade e de baixo custo ⁽¹⁷⁾. Por essas razões nos experimentos realizados nesse trabalho, a tirosina foi utilizada como indicador do metabolismo protéico muscular. A concentração intersticial da tirosina detectada pela microdiálise no músculo esquelético reflete o balanço entre síntese e degradação das proteínas totais. De modo que um aumento da concentração desse aminoácido no interstício muscular indica uma mudança do balanço protéico em direção ao catabolismo, enquanto que sua diminuição significa uma mudança na direção oposta ^(3,18).

É sabido que o processo de difusão entre o interstício e o interior do cateter *in vivo* não alcança um equilíbrio perfeito. Isto se deve a inúmeros fatores como, por exemplo, a temperatura do animal, a área de inserção do cateter, o tamanho dos poros da membrana, o fluxo de perfusão, o fluxo sanguíneo local assim como as características

físico-químicas da substância de interesse e do próprio tecido ⁽¹²⁾. Portanto, a concentração do metabólito quantificada no dialisado é sempre menor que a sua verdadeira concentração intersticial. Em função disso, é essencial que todo cateter de microdiálise seja calibrado *in vivo*, determinando-se a capacidade de recuperação ou *recovery* do cateter ^(8,12). Uma vez conhecido o valor de recuperação é possível então corrigir o valor da concentração de tirosina na solução dialisada e assim obter a verdadeira concentração intersticial. Diferentes técnicas de calibração podem ser utilizadas *in vivo*, como por exemplo a do fluxo interrompido e a da calibração por equilíbrio ⁽¹⁹⁾. Como essas técnicas necessitam de um período de experimentação prolongado, optou-se neste estudo em calibrar os cateteres pela técnica da referência interna ou retrodiálise ⁽⁸⁾.

1.2. Metilxantinas.

As xantinas são alcalóides encontrados em diferentes vegetais com ampla distribuição geográfica. Podem ser classificadas em três principais grupos: 1. cafeína (1,3,7-trimetilxantina); 2. teofilina (1,3-dimetilxantina); 3. teobromina (3,7-dimetilxantina). São consumidas mundialmente como chocolates, chás e outras bebidas ⁽²⁰⁾.

As metilxantinas e seus derivados como a pentoxifilina (PTX) e a 3-Isobutil-1-Metilxantina (IBMX) têm como principal mecanismo de ação intracelular a inibição inespecífica da fosfodiesterase de nucleotídeos cíclicos ⁽²¹⁾. Essa enzima converte o 3'-5'AMPc (3'-5' adenosina monofosfato cíclico) em 5'AMP (5' adenosina monofosfato) ⁽²²⁾. O aumento do AMPc intracelular é responsável, dentre outras ações, pela ativação

da lipólise e glicogenólise ⁽²²⁾, pela inibição da degradação de proteínas no músculo esquelético ⁽²³⁾ e pela redução do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e outras citocinas em processos inflamatórios ⁽²⁴⁾.

Dentre os derivados de xantinas, a PTX tem sido utilizada na clínica para o tratamento da claudicação intermitente em pacientes com doenças vasculares periféricas e cerebrovasculares ^(25,26). Em animais, demonstrou-se que a PTX preserva a microcirculação intestinal na bacteremia ⁽²⁷⁾, mantém a função hepática, melhora o índice cardíaco ⁽²⁸⁾ e reduz a resposta inflamatória na sepse, principalmente por reduzir os níveis plasmáticos do TNF α ⁽²⁹⁾. Tem sido demonstrado que o tratamento experimental com as metilxantinas também é eficaz na redução do catabolismo protéico muscular em situações patológicas. Ratos sépticos ⁽³⁰⁾ ou com tumores hepáticos Yoshida AH-130 ⁽²⁴⁾ tratados com PTX apresentam redução na proteólise muscular quando comparados com animais não tratados. O efeito anti-proteolítico da PTX é, freqüentemente, associado à redução do TNF α plasmático ⁽³¹⁾. No entanto, estudos anteriores de nosso laboratório indicam que, pelo menos parte deste efeito, pode ser mediado pela ação direta da droga no músculo, aumentando o conteúdo de AMPc intracelular e com isso reduzindo a degradação de proteínas. Navegantes *et al.* ⁽³²⁾ demonstraram uma redução de até 50% da proteólise em músculos de ratos normais incubados na presença da IBMX ou do dibutiril AMPc, um análogo sintético do AMPc. O possível efeito antiproteolítico das metilxantinas pode fornecer uma importante alternativa terapêutica para a prevenção da perda de proteínas musculares em situações catabólicas como, por exemplo, a sepse, na qual a perda de massa muscular está diretamente associada à maior morbidade e mortalidade do paciente.

1.3. Sepses.

A sepsis é definida como uma intensa resposta inflamatória à colonização de microorganismos em tecidos estéreis, com uma profunda desestabilização hemodinâmica e metabólica ^(33,34). É uma das principais causas de morte no mundo, acometendo principalmente pacientes pós-cirúrgicos, poli-traumatizados e queimados ^(34,35). Anualmente, são documentados cerca de 750.000 novos casos nos Estados Unidos com uma mortalidade de quase 30% ⁽³⁴⁾. No Brasil, a sepsis representa o maior problema de saúde pública com uma incidência de 57 casos a cada 1000 pacientes por dia. No entanto, os dados epidemiológicos ainda são contraditórios principalmente devido à dificuldade em se definir e diferenciar clinicamente a sepsis de outros quadros clínicos relacionados ^(34,35).

1.3.1. Fisiopatologia.

As alterações hemodinâmicas como a isquemia e a hipoperfusão tecidual são uma das principais complicações da sepsis ⁽³⁶⁾. São alterações que comprometem o fluxo sanguíneo tornando-o heterogêneo (interrompido, contínuo ou intermitente). Essa condição prejudica o metabolismo oxidativo celular por gerar uma redução na utilização do oxigênio pelos tecidos, embora, agudamente, a oferta e a extração de oxigênio sejam mantidas normais ^(36,37). O distúrbio hemodinâmico é acompanhado por alterações hormonais e imunológicas como a resistência à insulina, o aumento dos glicocorticóides e a maior liberação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α e as interleucinas ^(31,38,39). Uma das principais alterações metabólicas observadas no paciente séptico é a

resposta catabólica na musculatura esquelética, principalmente devido ao aumento da degradação das proteínas miofibrilares ^(5,38). Essa perda de massa muscular resulta em fraqueza geral e fadiga muscular que pode evoluir para a falência dos músculos respiratórios e morte ^(38,40). Infelizmente, até o momento, não existem estratégias terapêuticas capazes de reduzir o catabolismo protéico muscular.

A sepse pode ser dividida, temporalmente, em duas fases distintas: a inicial ou aguda e a tardia ou crônica ⁽⁴¹⁾. A fase aguda caracteriza-se por ser hiperdinâmica e hipermetabólica, ou seja, os indivíduos apresentam aumento do índice cardíaco, redução da resistência vascular periférica e ativação do catabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas musculares, cuja função é fornecer aminoácidos que serão utilizados para a gliconeogênese e para a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado ^(42,43). Todavia, a permanência da infecção gera uma fase hipodinâmica e hipometabólica que se caracteriza pela deterioração do sistema cardiovascular, pela redução do metabolismo energético e exacerbação da degradação de proteínas, gerando a atrofia muscular esquelética, disfunção múltipla dos órgãos e o choque séptico ^(36,44).

1.3.2. Sepses Experimentais.

Os efeitos da sepse foram, inicialmente, estudados em modelos experimentais de endotoxemia. A endotoxina é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas conhecida como lipopolissacarídeo (LPS), que foi isolada pela primeira vez por André Boivin ⁽⁴⁵⁾. A partir de então, a infusão do LPS em animais de laboratório foi utilizada com o objetivo de simular, experimentalmente, a endotoxemia e o choque endotóxico observado em pacientes. Entretanto, esse modelo não reproduz com

fidelidade o que realmente acontece na clínica. Enquanto pacientes endotóxicos desenvolvem hiperglicemia e hiperinsulinemia, animais infundidos com LPS apresentam, inicialmente, hiperglicemia que evolui rapidamente para hipoglicemia, tornando assim esse modelo inviável para o estudo das alterações metabólicas encontradas na sepse^(45,46).

A indução da sepse experimental pode ser obtida por meio de outros modelos: (a) a infusão endovenosa de patógenos (em geral *E.coli*); (b) implantação de fezes na cavidade peritoneal e (c) a ligadura e punção do ceco (CLP). A CLP é o modelo que melhor reproduz os achados clínicos em animais experimentais⁽⁴⁵⁾. Inicialmente, Clowes *et al.*⁽⁴⁷⁾ descreveram o modelo de ligadura do ceco, tornando-o necrótico. A ligadura do ceco sem a punção foi insuficiente para gerar sepse, uma vez que os animais mostraram-se bem adaptados à necrose intestinal. Esse modelo foi aperfeiçoado ao se realizar a ligadura seguida da punção do ceco, gerando nos animais um quadro de sepse grave muito semelhante ao observado na clínica⁽⁴⁵⁾.

1.4. Objetivos.

Este trabalho teve como finalidade principal avaliar os possíveis efeitos anticatabólicos dos derivados de xantina no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos sépticos, utilizando para isso a técnica da microdiálise.

Os objetivos específicos foram:

1.4.1.-Padronizar a técnica da microdiálise para a investigação in situ do metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos;

1.4.2.-Estudar o efeito da sepse induzida por CLP (após 3, 6 e 10 horas) na concentração intersticial de tirosina no músculo tibial de ratos;

1.4.3.-Avaliar o efeito do tratamento sistêmico com pentoxifilina na concentração intersticial de tirosina no músculo tibial de ratos sépticos;

1.4.4.-Verificar o efeito do tratamento in situ com a pentoxifilina ou a isobutilmetilxantina na concentração intersticial de tirosina no músculo tibial de ratos sépticos;

1.4.5.-Quantificar o fluxo sanguíneo muscular e a pressão arterial média em ratos sépticos tratados, ou não, com os derivados de xantinas;

1.4.6.-Investigar o efeito in vitro da isobutilmetilxantina na proteólise total em músculos extensor digital longo (EDL) de ratos sépticos.

2. Materiais e Métodos.

2.1. Animais.

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 275g, e animais jovens pesando, aproximadamente, 70g da mesma linhagem, cedidos pelo biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. Ao saírem do biotério, os animais foram aclimatados em nova sala onde ficaram em caixas de acrílico dois a dois, mantidos em temperatura ambiente, $\pm 28^{\circ}\text{C}$, e submetidos a ciclos claro-escuro de 12 horas (acendendo-se as luzes às 06h00 da manhã e desligando-as às 18h00). Os animais foram alimentados com ração balanceada Purina Labina[®] (23% de proteínas; 4% de gorduras; 50% carboidratos e 23% outros componentes.) para roedores e oferecida água *ad libitum*. Antes do início dos experimentos, o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEA; Proc.n^o 6040/03).

2.2. Estudo do metabolismo de proteínas pela microdiálise.

2.2.1. Microdiálise: procedimento geral.

Foram utilizados cateteres de microdiálise do tipo linear (figura 1A), os quais foram confeccionados manualmente, utilizando-se uma membrana de diálise semipermeável (Cuprophane, 18 mm de comprimento por 0.3 mm de diâmetro, 3 kDa de limite de permeabilidade) colada em ambas as extremidades a tubos de polietileno

PE-10 (comprimento padrão de 50 mm). As membranas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Peter Lönnroth, da Universidade de Gutemburgo (Suécia).

O cateter de microdiálise foi inserido longitudinalmente no músculo tibial anterior com auxílio de cânula-guia e perfundido a um fluxo constante de 1 µl/min com solução de perfusão (solução de NaCl 0,9% contendo glicose 1 mM, tirosina fria 50 µM, albumina bovina 0,5% e [¹⁴C]-tirosina (figura 1B)). Após um período de equilíbrio inicial de 30 minutos considerado a partir do início do gotejamento da solução de perfusão, os músculos foram dialisados ao longo de 90 minutos. O dialisado foi coletado diretamente em tubos de microcentrífuga e, em seguida, mantido a -20°C em solução de ácido tricloroacético (TCA 5%). O sangue coletado da artéria carótida esquerda foi imediatamente centrifugado, sendo o plasma separado e desproteínizado com ácido perclórico (PCA 1N) e congelado a -20°C para posterior análise. As concentrações de tirosina no dialisado (50µl), na solução de perfusão (50 µl) e no plasma (100 µl) foram determinadas pelo método fluorimétrico descrito por Waalkes *et al.*⁽¹⁷⁾.

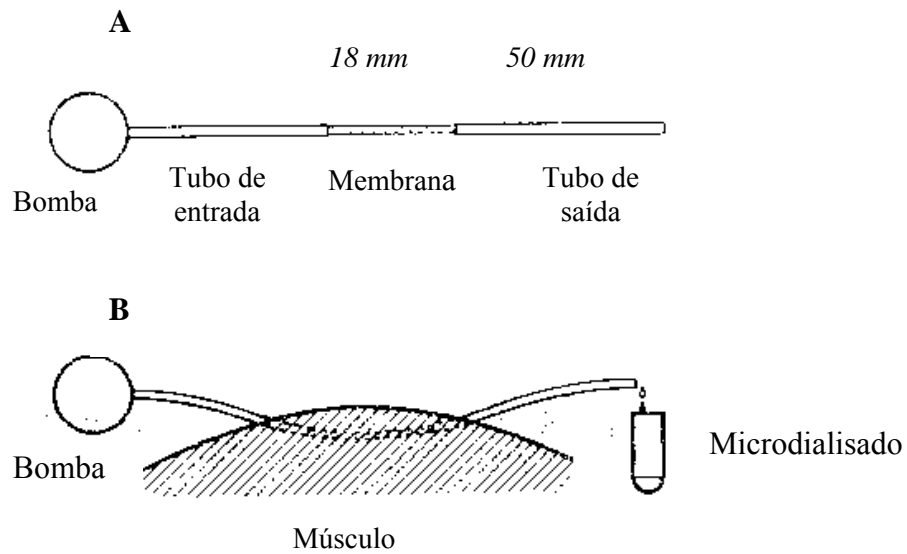


Figura 1. Desenho esquemático de um cateter linear (A). O cateter pode ser facilmente inserido no músculo esquelético com a ajuda de uma cânula-guia e conectado à bomba de microperfusão (B). Adaptado de Lönnroth *et al.* ⁽⁴⁹⁾.

2.2.2. Determinação do fator de recuperação (“recovery”) dos cateteres.

Todo cateter de microdiálise foi, individualmente, calibrado *in vivo*, determinando-se a sua capacidade de recuperação da tirosina. Nesse trabalho utilizou-se a técnica da referência interna, na qual os cateteres foram perfundidos com solução contendo [¹⁴C]-tirosina (~2500 DPM, 0,05 mmol/l) como marcador radioativo ⁽⁸⁾. Partindo do princípio que a difusão é um processo bidirecional, ou seja, que a saída da tirosina da solução de perfusão para o tecido é igual à entrada desta no cateter, a extração fracional da marca radioativa corresponde ao valor de recuperação do metabólito não marcado ⁽⁸⁾.

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

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

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

2.2.3. Cálculos para determinação da concentração intersticial de tirosina.

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

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

Fator de recuperação

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

2.3. Padronização da técnica de microdiálise.

Para a padronização da microdiálise foram utilizados animais normais (não submetidos à cirurgia), os quais foram anestesiados com tiopental sódico (50mg/Kg, i.p.), traqueostomizados com cateter de polietileno PE-240 (Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA) e canulados na artéria carótida esquerda (cateter PE-50) para aferição da pressão arterial média (PAM) e coleta de amostras de sangue. Os animais foram mantidos em mesa cirúrgica aquecedora (Insight[®]) com temperatura mantida em 37°C. O cateter de microdiálise foi inserido no músculo tibial anterior conforme descrito anteriormente. Os músculos foram dialisados com solução de perfusão a um fluxo constante de 1µl/min durante 30 minutos de equilíbrio e ao longo de 240 minutos de experimento, o qual foi dividido em três intervalos consecutivos de 80 minutos cada. Após o término de cada intervalo foram coletadas amostras do dialisado, solução de perfusão e sangue arterial da carótida esquerda para determinação do fator de recuperação do cateter, da concentração intersticial, arterial e a diferença I - A de tirosina (figura 2).

Para a confirmação do valor da concentração intersticial de tirosina quantificado pela técnica da referência interna, um grupo de músculos de animais normais foi perfundido a um fluxo constante de 0,3 µl/min. Em tecidos dialisados a um fluxo baixo o processo de difusão é perfeito (100% de recuperação)⁽¹³⁾ não sendo, portanto, necessário o uso de radioativos para calibração do cateter. Nessas condições, a concentração do metabólito no dialisado é semelhante a sua concentração no interstício.

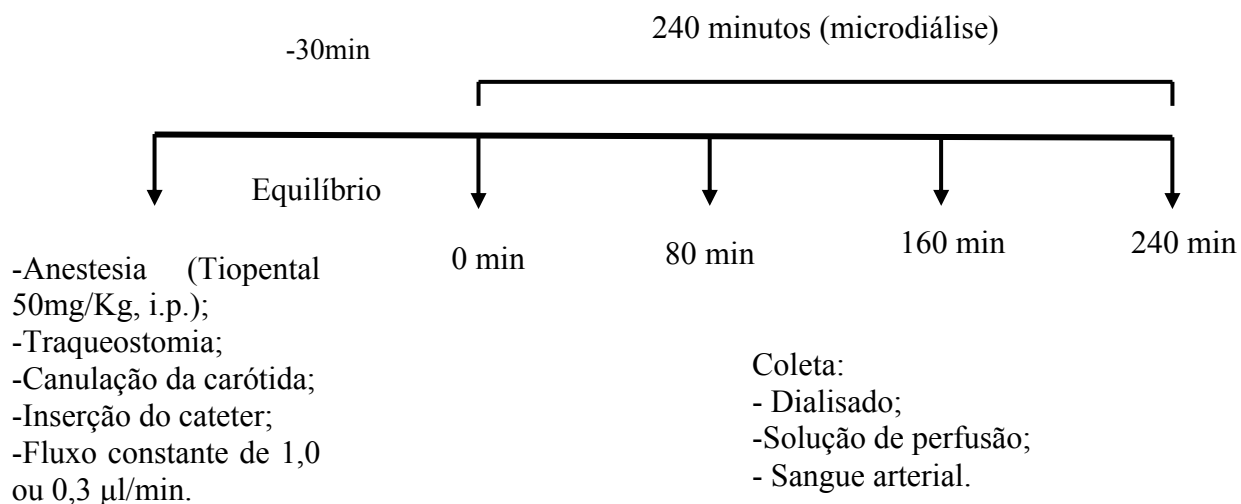


Figura 2. Protocolo experimental utilizado para a determinação da concentração intersticial de tirosina no músculo tibial anterior de ratos normais.

2.4. Padronização do modelo de sepse experimental.

2.4.1. Indução da sepse pela ligadura e punção do ceco (CLP).

O grupo séptico foi submetido a laparotomia e exteriorização do ceco, o qual foi ligado na base com linha número 10, tomando-se o cuidado de não obstruir o trânsito intestinal. O ceco foi puncionado duas vezes na região distal com agulha número 16, próximo à ligadura, preservando-se a vascularização local. Após a punção, o ceco foi suavemente pressionado para extravasamento do conteúdo fecal através das perfurações realizadas. Em seguida, a parede abdominal foi suturada com fio de nylon número 4. Para reposição de volume os animais receberam uma injeção de solução salina 0,9% (10 ml/100g, s.c.)^(41,45). Os animais do grupo sham foram submetidos aos mesmos procedimentos do grupo sépticos à exceção da ligadura e punção do ceco. Ambos os

grupos foram divididos em 6 sub-grupos e estudados às 3, 6 e 10 horas da CLP ou cirurgia fictícia (sham).

Para confirmação da sepse foram realizadas hemoculturas (n = 5 ratos) utilizando-se o sistema hemobac trifásico[®].

2.4.2. Avaliação de parâmetros metabólicos.

Com objetivo de avaliarmos o efeito da sepse experimental no ganho ponderal, no consumo de água e na excreção urinária, os animais foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas por dez horas. Este foi o tempo máximo de sepse utilizado nesse trabalho para o estudo das alterações do metabolismo de proteínas. Neste grupo também foi aferida a temperatura retal.

Após três horas da indução da sepse, foi coletada uma pequena amostra de sangue arterial da carótida esquerda para a determinação do hematócrito e da gasometria, assim como para a dosagem de glicose, lactato e uréia. Em seguida, os animais foram sacrificados por excesso de anestésico (tiopental) e extraído 500 mg de tecido para determinação do conteúdo hepático e muscular de glicogênio. As amostras foram colocadas em tubos de centrífuga contendo 2ml de KOH 30% para extração⁽⁴⁹⁾ e determinação do conteúdo de glicogênio pelo método de antrona segundo Carrol *et al.*⁽⁵⁰⁾.

2.5. Estudo do metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos sépticos pela microdiálise.

O grupo de 3 horas foi anestesiado somente com tiopental sódico (50mg/Kg, i.p.). Após 1 hora da cirurgia, os músculos dos animais foram dialisados por 120 minutos, sendo os 30 minutos iniciais correspondentes ao período de equilíbrio e os 90 minutos seguintes o de coleta. Ao longo de todo o experimento, a pressão arterial foi aferida em intervalos de 15 minutos. Ao final do experimento (3 horas após a cirurgia) foi coletada uma amostra do dialisado, da solução de perfusão e do sangue arterial (figura 3).

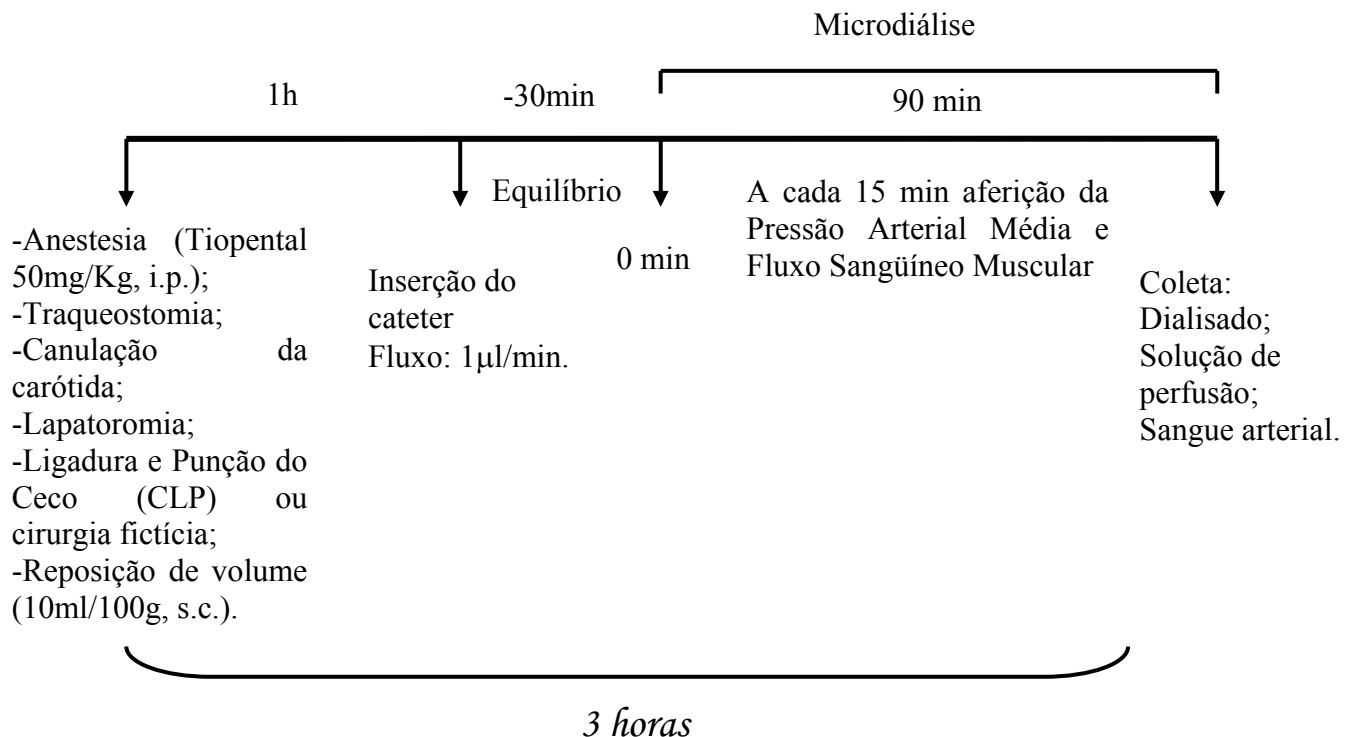


Figura 3. Protocolo experimental utilizado para o estudo dos efeitos da sepse de 3 horas no metabolismo de proteínas na musculatura esquelética de ratos pela microdiálise.

Os animais dos grupos 6 e 10 horas foram inicialmente anestesiados com uma mistura, em proporções iguais, de xilazina e cloridrato de ketamina (0,1ml/100g, i.p.) e submetidos à CLP ou cirurgia fictícia. Após 4 e 8 horas da cirurgia, esses animais foram novamente anestesiados com tiopental sódico (50mg/Kg, i.p.), traqueostomizados, canulados na artéria carótida e mantidos nessa condição durante todo período de microdiálise. Foram coletadas amostras da solução de perfusão, dialisado e sangue arterial da carótida esquerda após 6 e 10 horas da cirurgia (figura 4).

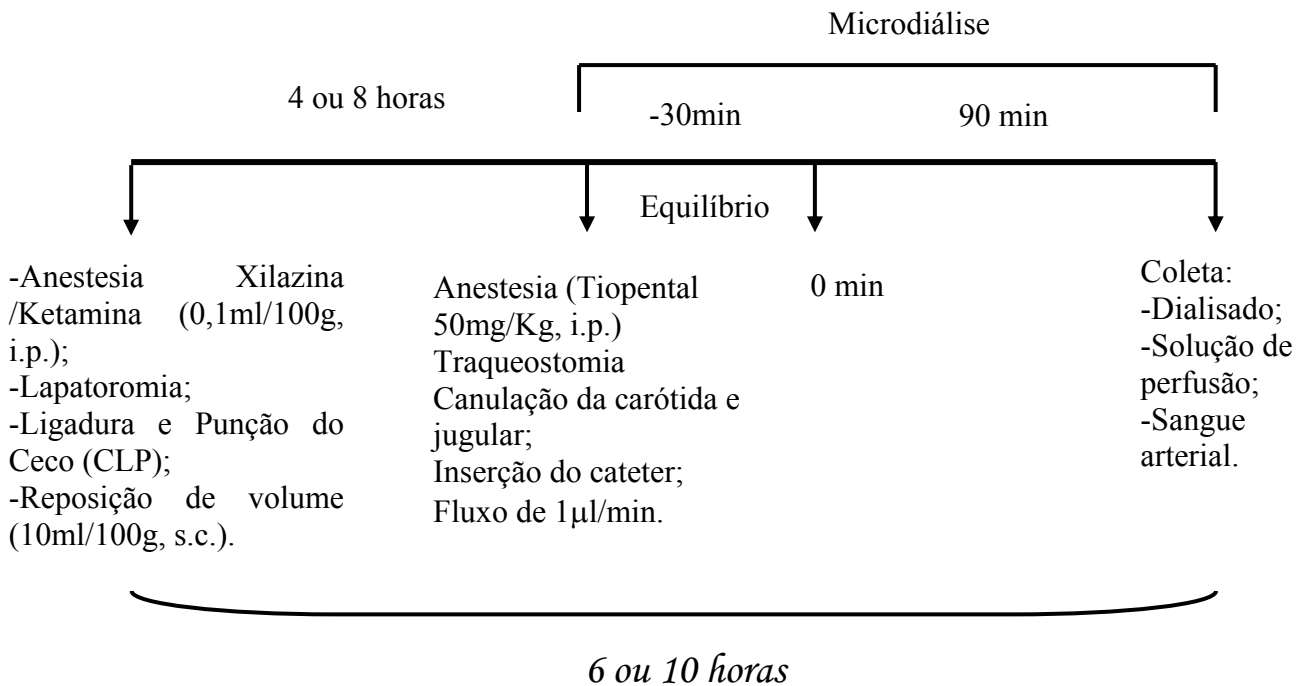


Figura 4. Protocolo experimental utilizado para o estudo dos efeitos da sepse de 6 e 10 horas no metabolismo de proteínas na musculatura esquelética de ratos pela microdiálise.

2.6. Determinação dos parâmetros hemodinâmicos.

2.6.1. Pressão Arterial Média (PAM).

Para a avaliação do estado hemodinâmico dos animais, a PAM foi aferida em todo experimento de microdiálise. A PAM foi avaliada diretamente na artéria carótida em intervalos de 15 minutos por meio de um transdutor de pressão conectado a um amplificador (Braile Biomédica[®]).

2.6.2. Quantificação do Fluxo Sangüíneo Muscular (FSM).

Esses experimentos tiveram como objetivo avaliar o efeito da sepse de 3 horas e do tratamento com os derivados de xantina no fluxo sangüíneo local no tibial anterior. Para a avaliação qualitativa do FSM utilizou-se a técnica do *clearance* do etanol, que é adicionado à solução de perfusão do músculo. O princípio dessa técnica se baseia na propriedade do etanol ser um metabólito inerte, isto é, não é secretado nem absorvido pelo músculo ⁽⁵²⁾. Existe uma relação inversamente proporcional entre a extração fracional do etanol e o fluxo sangüíneo local, de modo que toda redução na concentração de etanol no dialisado muscular significa aumento do fluxo sangüíneo local (vasodilatação), assim como seu aumento no dialisado significa redução do fluxo sangüíneo (vasoconstricção). Nesses experimentos, o tibial anterior foi perfundido a um fluxo constante de 1µl/min com solução de perfusão (descrita anteriormente) acrescida de etanol absoluto (5mM), durante 90 minutos. O etanol foi quantificado no dialisado

muscular a cada 15 minutos de experimento e na solução de perfusão ao final deste.

Para se obter a extração fracional de etanol foi empregada a seguinte fórmula:

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

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

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

2.7. Efeitos sistêmicos da pentoxifilina (PTX) no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos.

Os efeitos do tratamento sistêmico com PTX (Sigma[®]) no metabolismo protéico foram investigados em músculos de animais sham ou sépticos de 3 horas. Esses animais foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos anteriormente e canulados na veia jugular direita para a administração da droga por meio de um tubo de polietileno (PE-50) conectado a uma bomba de microinfusão (Insight BI2000[®]). Os animais foram infundidos, durante a primeira hora após a CLP ou cirurgia fictícia, com PTX (50 mg/Kg) a um fluxo constante de 17 μ l/min (figura 5).

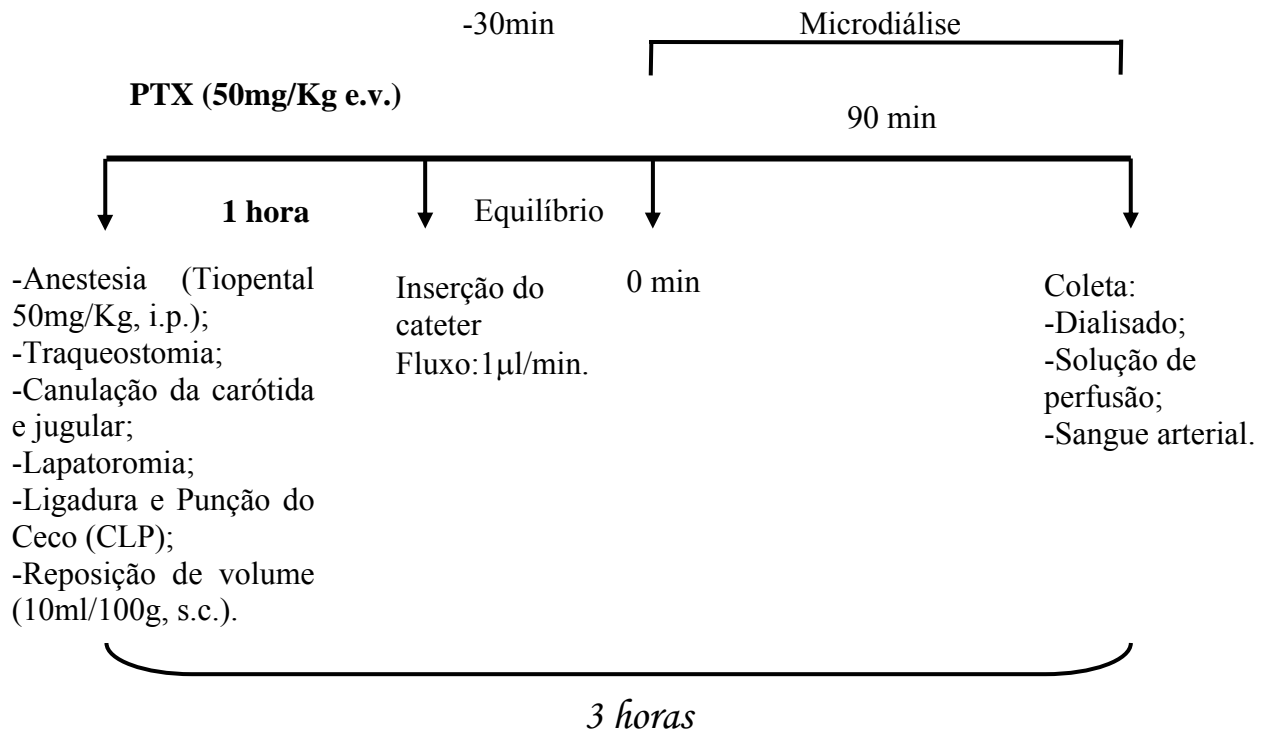


Figura 5. Protocolo experimental utilizado para o estudo dos efeitos do tratamento sistêmico com pentoxifilina (PTX; 50mg/Kg) no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos sépticos de 3 horas.

2.8. Efeitos *in situ* da pentoxifilina (PTX) e da 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX) no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos.

Com o objetivo de investigar os efeitos *in situ* dos derivados de xantina no metabolismo protéico, músculos esqueléticos de animais sham e sépticos de 3 horas foram perfundidos com PTX ou IBMX, na concentração de 1mM, conforme protocolo descrito na figura 3.

2.9. Procedimento experimental para o estudo da proteólise *in vitro* em músculos esquelético de ratos.

A avaliação da degradação de proteínas em músculos esqueléticos de ratos foi realizada 3 horas após a indução da CLP ou cirurgia fictícia. Nesses experimentos, músculos contralaterais dos animais sépticos foram incubados na presença de IBMX (1mM), na mesma concentração utilizada *in situ*.

Na manhã do experimento, animais com pesos próximos a 70 g foram anestesiados por éter e submetidos à laparotomia seguida ou não da CLP. Três horas após a cirurgia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical numa seqüência alternada entre os grupos, removendo-se rapidamente o músculo EDL. Em seguida, os músculos foram pesados em balança eletrônica digital (BEL engineering®) e incubados em tampão Krebs Ringer Bicarbonato (NaCl 0,120M; NaHCO₃ 0,015M; KCl 4,828 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 1,212 mM; CaCl₂ 2,4 mM e pH 7,4) na presença de glicose (5 mM) e cicloxemida (0,5 mM).

O método de quantificação da atividade proteolítica utiliza o músculo íntegro fixado por meio dos seus tendões a suportes de acrílico para o EDL, mantendo-se assim o seu comprimento de repouso. 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 do conteúdo de ATP, de fosfocreatina e glicogênio, reproduzindo as características dos músculos em crescimento *in vivo* ^(2,3).

2.9.1. Avaliação da atividade proteolítica.

A atividade proteolítica foi estimada por meio da liberação de tirosina de proteínas de músculos incubados na presença de cicloheximida, a qual impede a reutilização dos aminoácidos para a síntese protéica. A liberação de tirosina pelo músculo isolado reflete a velocidade de degradação de todas as classes de proteínas celulares, uma vez que este aminoácido é distribuído em todas proteínas celulares⁽⁵³⁾. Para a determinação da degradação de proteínas, os músculos foram aerados com uma mistura de carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) e incubados por 1 hora em banho, sob agitação constante a 37°C, a fim de estabelecer o equilíbrio da velocidade de liberação da tirosina para o meio de incubação. Após esse período de pré-incubação, os meios eram renovados e a incubação se processava com o mesmo tipo de meio por 2 horas. No final do período de incubação, 1 ml do meio era coletado e adicionado a 0,25 ml de ácido perclórico 1,5 N para a determinação da tirosina liberada.

2.10. Análise histológica.

Para a avaliação do grau de lesão tecidual causada pela inserção do cateter de diálise, foi realizada a análise histológica do músculo tibial anterior de animais normais canulados ou não. Também foram analisados músculos de animais sham ou sépticos de 3 horas. Após o experimento de microdiálise, os animais foram sacrificados por excesso de anestésico (tiopental). O coração foi exteriorizado e a veia cava inferior seccionada. Em seguida, introduziu-se no ventrículo esquerdo um cateter de polietileno (P-240) fixado com agulha 25x7, por onde perfundi-se, aproximadamente, 100 ml de solução

de formol-cálcio (formaldeído PA a 40%, 10ml; água destilada, 90ml; acetato de cálcio, 1g). Após a perfusão do fixador histológico, o músculo tibial anterior foi retirado e fixado na mesma solução de formol-cálcio durante 24 horas.

O músculo foi seccionado em 3 segmentos semelhantes, sendo o terços superior e inferior desprezados. O terço médio foi inicialmente lavado e imerso em etanol 70% e progressivamente desidratado em etanol 95% e, em duas passagens sucessivas, em etanol absoluto. O tempo de imersão em cada solução foi de 30 minutos. Posteriormente, o músculo foi incluso em historesina (LAICA[®]). Para isso, o fragmento foi transferido para uma solução de etanol-resina por 3 horas e, em seguida, transferido para a resina pura, onde permaneceu *overnight*. O fragmento muscular foi acondicionado em formas nas quais se adicionou a mistura de historesina e polimerizador (Historesin[®], Leika, Alemanha). A polimerização foi realizada a vácuo em bomba comum. Uma vez polimerizada a resina, os blocos foram retirados das formas e fixados em suportes de madeira com cola de secagem rápida.

A microtomia foi feita com navalha de vidro, tendo sido realizados cortes de 2 µm de espessura. Os cortes foram colhidos em lâminas previamente tratadas com poli-L lisina e distendidos em cubas de água fria. Os cortes foram hidratados e corados em solução de hematoxilina por 15 minutos. Em seguida, foram lavados em água corrente para retirar o excesso do corante, sendo adicionada eosina por 10 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada, seguindo-se a desidratação e montagem em verniz.

A avaliação do material foi realizada por meio da contagem da população total de fibras musculares a partir da seleção de um corte de músculo utilizando o microscópio de luz (Olympus[®] Tokyo) dotado de ocular com retículo com linhas paralelas horizontais e verticais que dividiam o campo microscópico em 4 regiões

distintas. A morfometria foi realizada com o mesmo equipamento, com ocular milimetrada, em intervalos de 2 μm e objetiva de valor 10x.

2.11. Análise bioquímica.

As concentrações de tirosina no dialisado, plasma, solução de perfusão e meio de incubação foram determinadas pelo método fluorimétrico. A contagem de radioativo da [^{14}C]-tirosina na solução de perfusão e no dialisado foi determinada em 10 μl de cada amostra diluída em 4 ml de líquido de cintilação biodegradável (Fisher Scientific[®]). A leitura foi feita em espectômetro de cintilação líquida PACKARD 1900[®] no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

As concentrações plasmáticas de glicose e lactato foram determinadas no analisador bioquímico (YSI SELECT[®]). Foi utilizado kit comercial para a dosagem bioquímica de uréia (KATAL[®]). Foi realizada gasometria (Radiometer ABL 5[®]) para determinação do pH, pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2), pressão parcial de oxigênio (PO_2), excesso de base (BE) e bicarbonato (HCO_3^-). O hematócrito foi quantificado por microcapilares de vidro.

2.12. Análise estatística.

Os resultados foram expressos como Médias \pm EP (Erro Padrão). Para a análise estatística e interpretação dos resultados entre os grupos sham e sépticos ao

longo do tempo foi empregada à análise de variância (ANOVA) e o teste t de Student para comparação entre as médias, sendo adotado 5% como nível de significância.

3. Resultados

3.1. Concentração intersticial de tirosina em músculo esquelético de ratos normais.

Com o objetivo de quantificar a concentração intersticial de tirosina na musculatura esquelética em situações basais, músculos de ratos foram perfundidos a um fluxo constante de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, por 240 minutos. Utilizando-se a referência interna como método de calibração do cateter, o valor de recuperação obtido foi de $33 \pm 1\%$ (figura 6B). A figura 6A mostra que a concentração de tirosina no interstício muscular, calculada a partir dos valores de recuperação do cateter, foi de $88 \pm 4 \text{ nmol}/\text{ml}$. A concentração de tirosina no interstício foi sempre maior que sua concentração arterial ($57 \pm 3 \text{ nmol}/\text{ml}$). Todos esses valores se mantiveram constantes ao longo dos 240 minutos de experimentação. Para confirmação desses resultados, músculos de animais normais foram dialisados a um fluxo de $0,3 \mu\text{l}/\text{min}$. Nesses experimentos, a concentração intersticial de tirosina foi de $82 \pm 3 \text{ nmol}/\text{ml}$, sendo este valor semelhante àquele obtido pela técnica da referência interna.

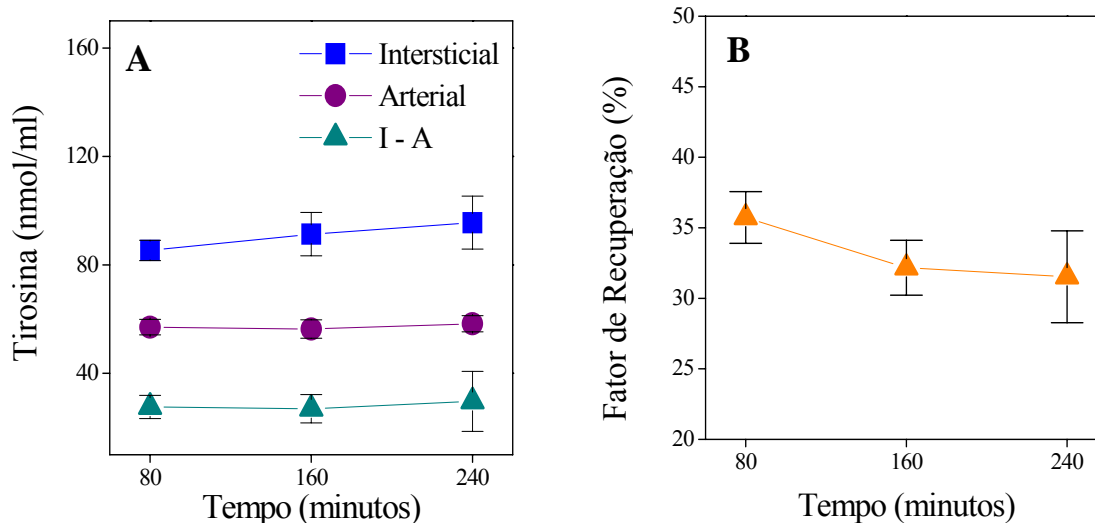


Figura 6. Concentração intersticial (I), arterial (A) e diferença I – A de tirosina em músculos de ratos normais (A). Fator de recuperação ou “*recovery*” dos cateteres de microdiálise (B). Os valores são expressos como média \pm EP de 12-15 ratos.

3.2. Efeitos da sepse experimental induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP).

3.2.1. Características dos animais.

A sepse nos animais submetidos à ligadura e punção do ceco foi confirmada por meio de hemoculturas, as quais foram positivas para fungos e bactérias após duas horas da cirurgia. Nos grupos de seis e dez horas de sepse foram observados sinais característicos de infecção, tais como piloereção, secreção ocular, letargia e secreção purulenta na cavidade abdominal após o sacrifício.

3.2.2. Efeito nos parâmetros metabólicos.

Para avaliação do ganho de peso, ingestão de água e diurese, animais sham ou sépticos foram mantidos em gaiolas metabólicas. Após dez horas da cirurgia, observou-se um aumento no peso corporal de 8% no grupo séptico (285 ± 3 vs 263 ± 5 g no grupo sham). Os animais sham não ingeriram água, mas urinaram $6 \pm 0,4$ ml. Durante esse período, os animais sépticos não ingeriram água e nem urinaram. A temperatura corporal do grupo séptico foi reduzida em $1,2^\circ\text{C}$ ($35,8 \pm 0,3$ vs $37 \pm 0,01^\circ\text{C}$, no grupo sham).

Para uma melhor compreensão dos efeitos metabólicos causados pela sepse, foi traçado um perfil bioquímico nos animais do grupo de 3 horas. A tabela 1 mostra que os valores da glicemia, PO_2 e hematócrito do grupo séptico não foram diferentes do sham. No entanto, as concentrações plasmáticas de uréia e lactato aumentaram em 73% e 75%, respectivamente. Observou-se também um decréscimo na PCO_2 (46%), na concentração plasmática de bicarbonato (50%) e no excesso de base, nos animais sépticos (tabela 1).

Em animais normais foi avaliado o efeito da inserção do cateter, durante 3 horas, nas reservas de glicogênio no músculo tibial anterior. Constatou-se que a lesão mecânica não alterou o conteúdo de glicogênio muscular ($0,55 \pm 0,02$ %) quando comparado ao músculo contralateral não lesado ($0,49 \pm 0,02$ %). Em animais sham, a cirurgia fictícia reduziu o glicogênio hepático ($1,2 \pm 0,1$ vs $4,4 \pm 0,5$ %, no grupo controle sem cirurgia), mas não modificou o glicogênio muscular ($0,48 \pm 0,03$ vs $0,49 \pm 0,02$ %, no grupo controle sem cirurgia). A sepse provocou uma redução de 60% e 86% no conteúdo de glicogênio muscular e hepático, respectivamente (tabela 1).

3.2.3. Efeito no metabolismo de proteínas na musculatura esquelética de ratos.

A concentração intersticial muscular (93 ± 5 nmol/ml), a arterial (71 ± 7) e a diferença I – A (33 ± 7 nmol/ml) de tirosina dos animais sham foram semelhantes aos controles (90 ± 7 ; 57 ± 3 e 33 ± 2 nmol/ml, respectivamente). De acordo com a figura 7, verifica-se que as concentrações intersticial, arterial e a diferença I – A foram sempre maiores no grupo séptico em relação ao grupo sham. As maiores concentrações de tirosina no interstício e no plasma arterial foram observadas no grupo de 6 horas quando comparado ao grupo de 3 e 10 horas (figuras 7A e B).

3.2.4. Efeito nos parâmetros hemodinâmicos.

A PAM do grupo séptico foi sempre menor em relação ao grupo sham, independentemente do tempo estudado de infecção (figura 8). A extração fracional de etanol, como método de avaliação do FSM, manteve-se inalterada nos primeiros 45 minutos de diálise dos músculos sépticos, aumentando a partir deste momento em 33% em relação ao grupo sham (figura 9). O aumento dessa relação significa que após 3 horas de sepse há redução do fluxo sanguíneo muscular.

Tabela 1. Efeito da sepse experimental induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP) nas concentrações plasmáticas de uréia, glicose e lactato, no conteúdo de glicogênio hepático e muscular, pH, pressões parciais de oxigênio e dióxido de carbono, hematócrito, bicarbonato e excesso de base após 3 horas da cirurgia.

Grupo	Uréia (mg/dL)	Glicose (mM)	Lactato (mM)	Glicogênio Hepático (%)	Glicogênio Muscular (%)	pH	PO ₂ (mmHg)	PCO ₂ (mmHg)	Hematócrito (%eritrócitos)	HCO ₃ ⁻ (mM)	Excesso de base (EB) (mM)
Sham	38 ± 3,4	5,8±0,3	1,9±0,1	1,12±0,01	0,45±0,03	7,33 ± 0,006	92 ± 3	37,3 ± 1,64	42,5 ± 1,9	19,3 ± 0,7	-5,4 ± 0,6
Séptico	65,8 ± 5,2*	6,9 ± 0,6	3,3 ± 0,38*	0,15±0,01*	0,18±0,01*	7,3 ± 0,01	110 ± 5*	20,11± 0,99*	46,8 ± 1,4	9,66 ± 0,7*	-15 ± 1,1*

Os valores são expressos como média ± EP de 8 ratos; * p < 0,05 em relação ao sham.

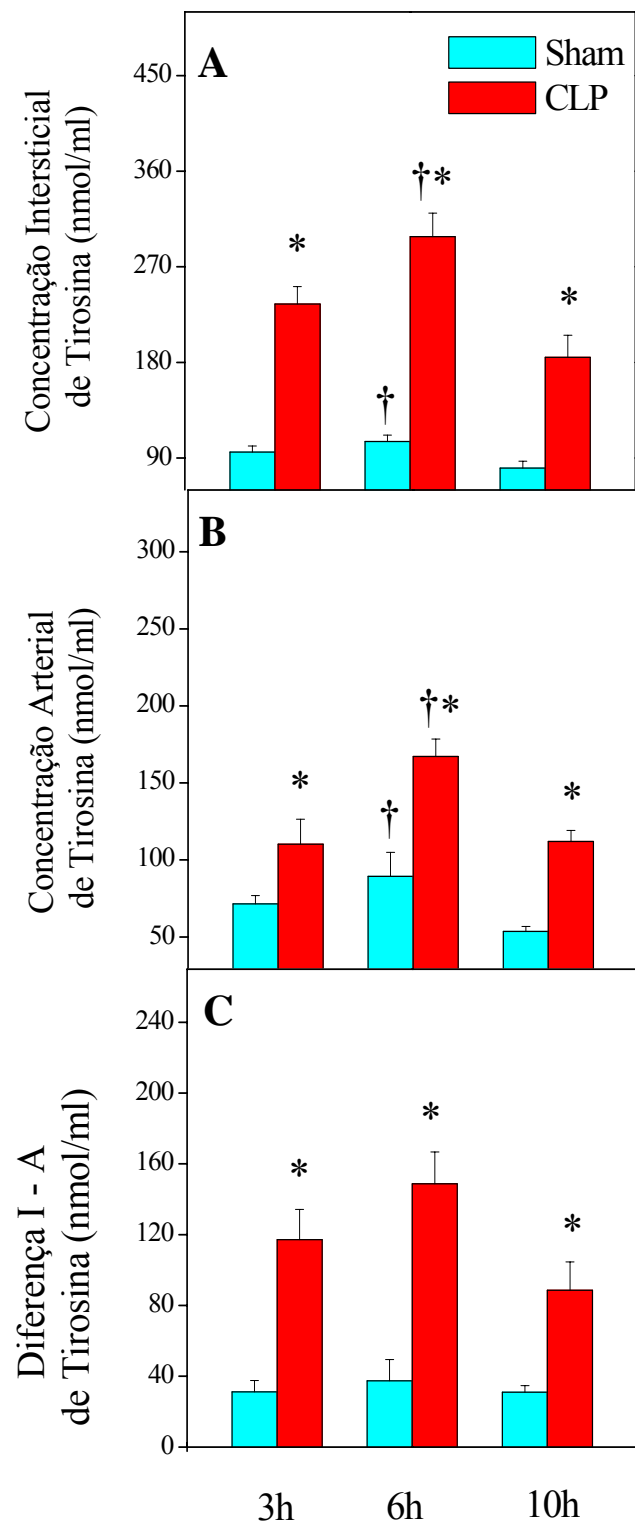


Figura 7. Efeito da sepse experimental induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP) nas concentrações intersticial (A), arterial (B) e diferença I - A (C) de tirosina após 3, 6 e 10 horas da cirurgia. Os valores são expressos como média \pm EP de 8-14 ratos. * $p < 0,05$ em relação ao sham ; † $p < 0,05$ em relação ao tempo.

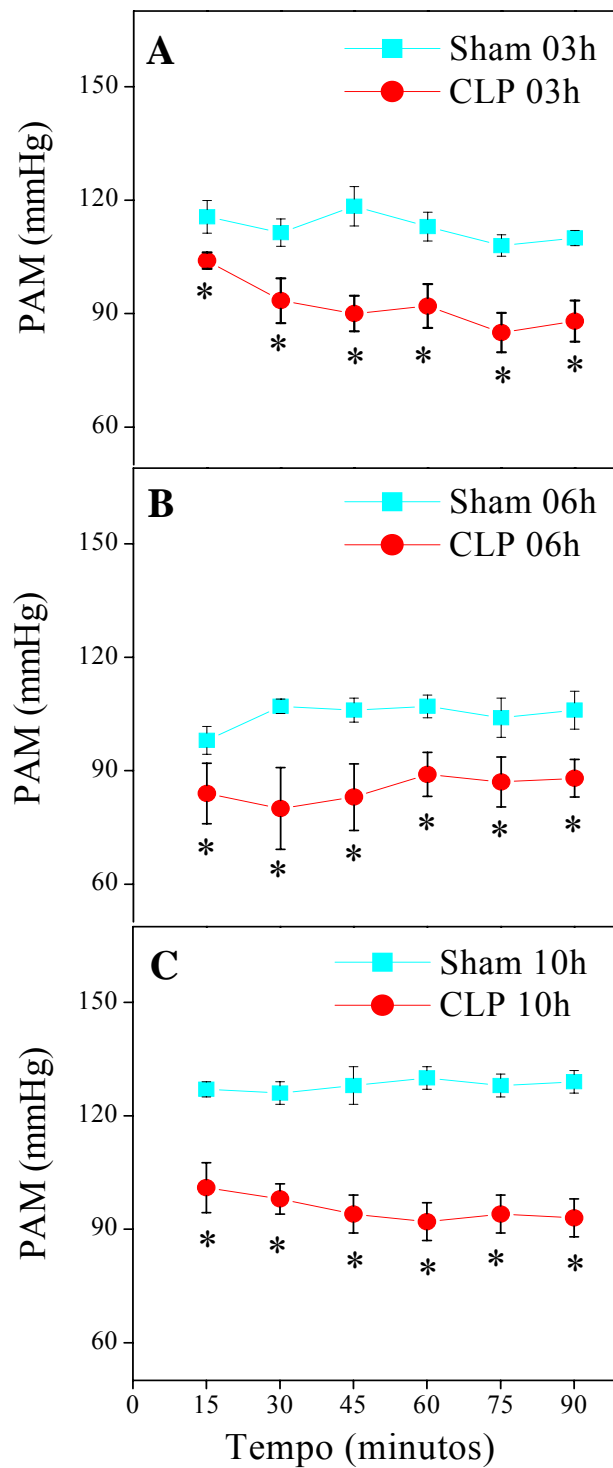


Figura 8. Efeito da sepse experimental induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP) na pressão arterial média (PAM), após 3 (A), 6 (B) e 10 horas (C) da cirurgia. Os valores são expressos como média \pm EP de 8 ratos; * $p < 0,05$ em relação ao sham.

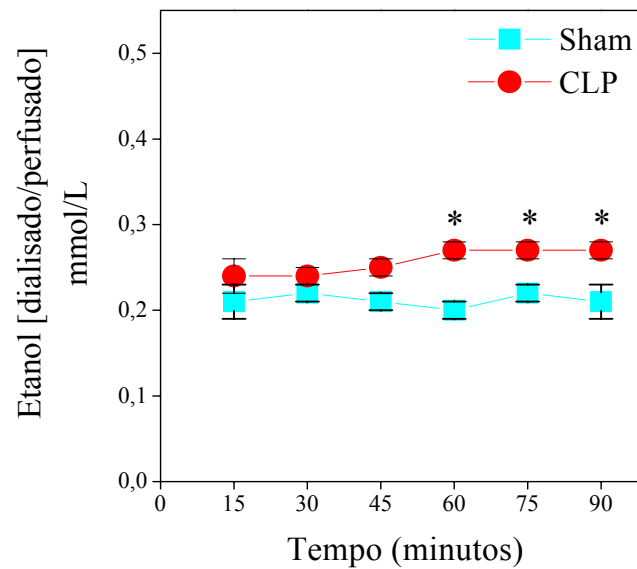


Figura 9. Efeito da sepse experimental induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP) na extração fracional de etanol no músculo tibial anterior de ratos após 3 horas da cirurgia. Os valores são expressos como média \pm EP de 8 ratos; * $p < 0,05$ em relação ao sham.

3.2.5. Efeitos na histologia dos músculos esqueléticos.

Nas figuras 10A e 10B, observam-se fibras musculares íntegras seccionadas transversalmente com contornos aproximadamente poligonais/arredondados, núcleos periféricos achatados, com cromatina compactada e nucléolos evidentes de ratos sham e sépticos após 3 horas, respectivamente. A inserção do cateter de microdiálise no músculo causou hemorragia focal acompanhada de áreas esparsas de necrose (figuras 10C e 10D), sem o comprometimento da citoarquitetura do músculo em ambos os grupos estudados. Não houve diferença na população de células necróticas no grupo séptico ($32 \pm 3,7$ células por secção de músculo analisado) quando comparada ao grupo sham ($30 \pm 5,9$ células por secção de músculo analisado). Observando-se a figura 10E e

10F, verifica-se que também não houve diferenças significantes na presença de células inflamatórias no interstício muscular de ratos sham e sépticos ($19 \pm 4,1$ vs. 15 ± 2 células por secção de músculo analisado, respectivamente).

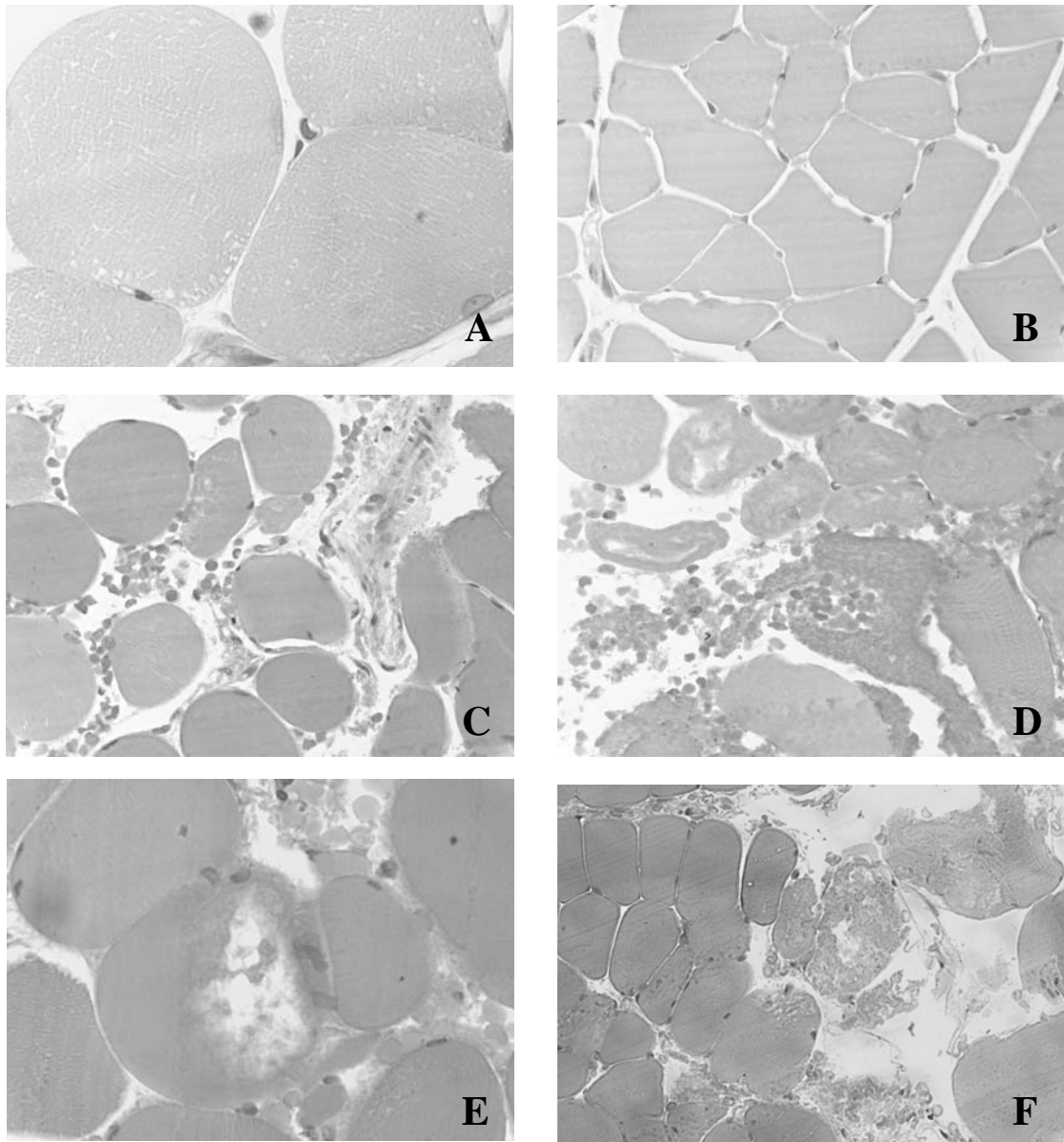


Figura 10. Análise histológica de músculo tibial anterior de ratos sépticos: B fibras íntegras, 400X; D células necróticas e hemorragia, 400X e F área com células necróticas e fragmentos de fibras, 230X. Grupo sham: A fibras íntegras, 630X; C infiltrado

inflamatório e hemorrágico, 400X e E área de rarefação e *debris necrotico*, 630X. Coloração H.E.

3.3. Efeito sistêmico da pentoxifilina (PTX) no metabolismo de proteínas e na hemodinâmica de ratos sham e sépticos.

Neste protocolo experimental, animais sham e sépticos foram tratados com PTX (50mg/Kg, e.v.), durante 1 hora, imediatamente após a cirurgia. A PTX reduziu a concentração intersticial e o gradiente I - A de tirosina nos ratos sépticos, mas não interferiu na concentração arterial desse aminoácido (figura 11B). Nenhum desses parâmetros foi alterado em animais sham (figura 11A).

A PTX também não interferiu com a PAM de animais sham, mas reduziu ainda mais nos animais sépticos, ao longo de todo o experimento (figura 12B). A extração fracional de etanol foi inalterada pela infusão sistêmica da PTX em animais sépticos (figura 13).

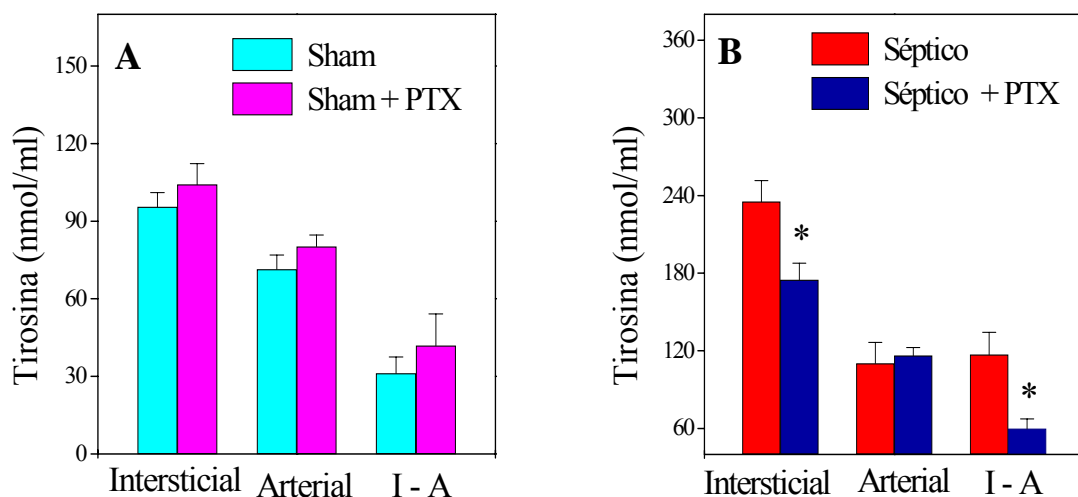


Figura 11. Efeito do tratamento sistêmico com PTX (50 mg/Kg, e.v.) nas concentrações intersticial (I), arterial (A) e diferença I – A de tirosina me ratos sham (A) e sépticos

(B). Os valores são expressos como média \pm EP de 6-8 ratos; * $p < 0,05$ em relação ao grupo não tratado.

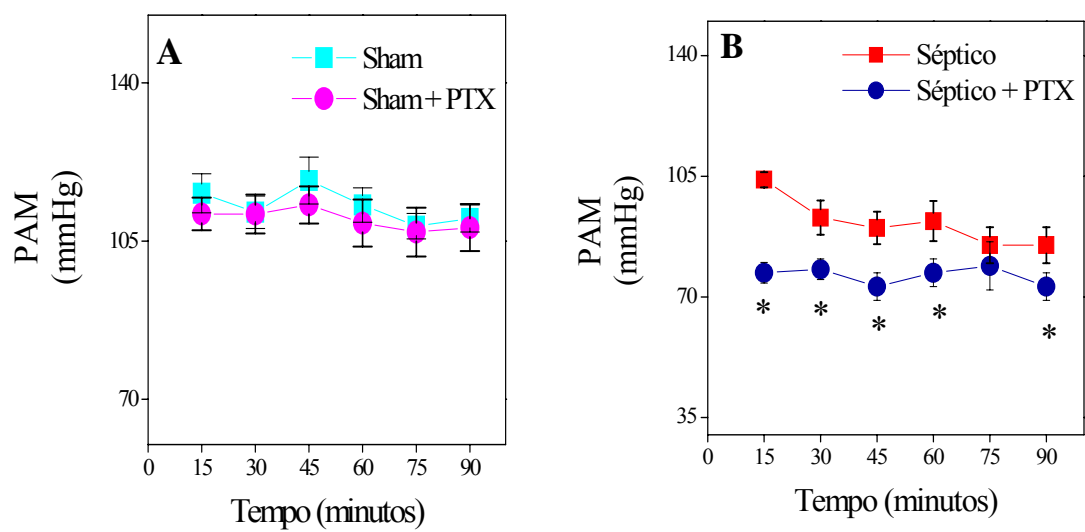


Figura 12. Efeito do tratamento sistêmico com PTX (50mg/Kg, e.v.) na pressão arterial média (PAM) de ratos sham (A) e sépticos (B). Os valores são expressos como média \pm EP de 6-8 ratos; * $p < 0,05$ em relação ao grupo não tratado.

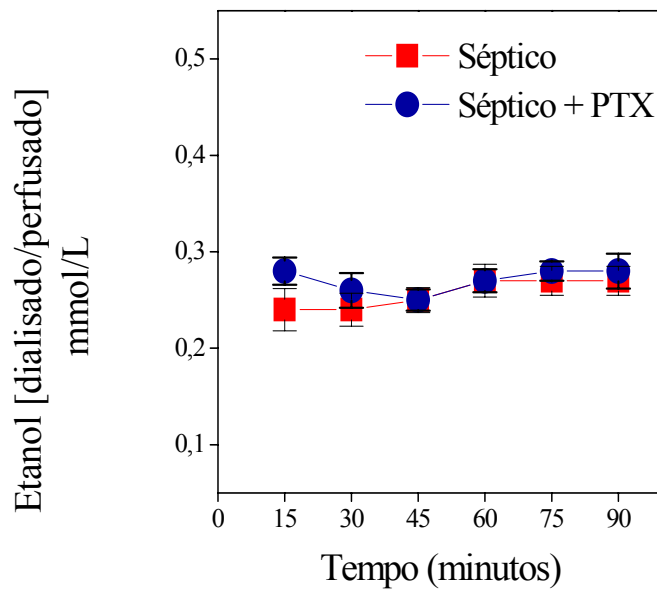


Figura 13. Efeito do tratamento sistêmico com PTX (50mg/Kg, e.v.) na extração fracional de etanol nos músculos de ratos sépticos. Os valores são expressos como média \pm EP de 6-8 ratos.

3.4. Efeitos da perfusão *in situ* com os derivados de xantina no metabolismo de proteínas e no fluxo sanguíneo muscular (FSM) de ratos sham e sépticos.

Músculos esqueléticos de ratos sham ou sépticos foram perfundidos com PTX ou IBMX (1mM), durante 90 minutos, após 1 hora da cirurgia (figura 3). A PTX *in situ* não alterou as concentrações intersticial, arterial e o gradiente I – A de tirosina, em ambos os grupo (figura 14). Músculos de animais sham perfundidos com IBMX apresentaram uma redução na concentração intersticial (27%) e na diferença I – A (48%) de tirosina (figura 15A). A IBMX reduziu em 41% o conteúdo de tirosina no interstício muscular e em 43% a diferença I – A deste aminoácido no grupo séptico (figura 15B). A concentração arterial de tirosina não foi alterada pela IBMX, em ambos os grupos (figura 15).

A PAM não foi alterada nos animais sham e sépticos perfundidos *in situ* com as metilxantinas (dados não mostrados). Quanto ao FSM, não se observaram alterações na extração fracional de etanol nos músculos perfundidos *in situ* com PTX (figura 16) ou IBMX (figura 17).

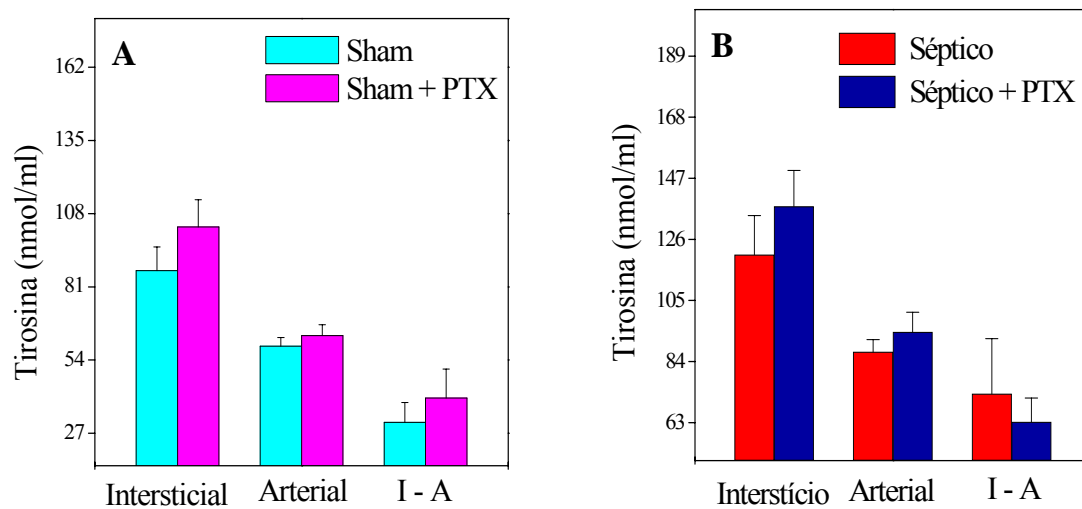


Figura 14. Efeito *in situ* da PTX (1mM) nas concentrações intersticial (I), arterial (A) e diferença I – A de tirosina em ratos sham (A) e sépticos (B). Os valores são expressos como média \pm EP de 8 ratos.

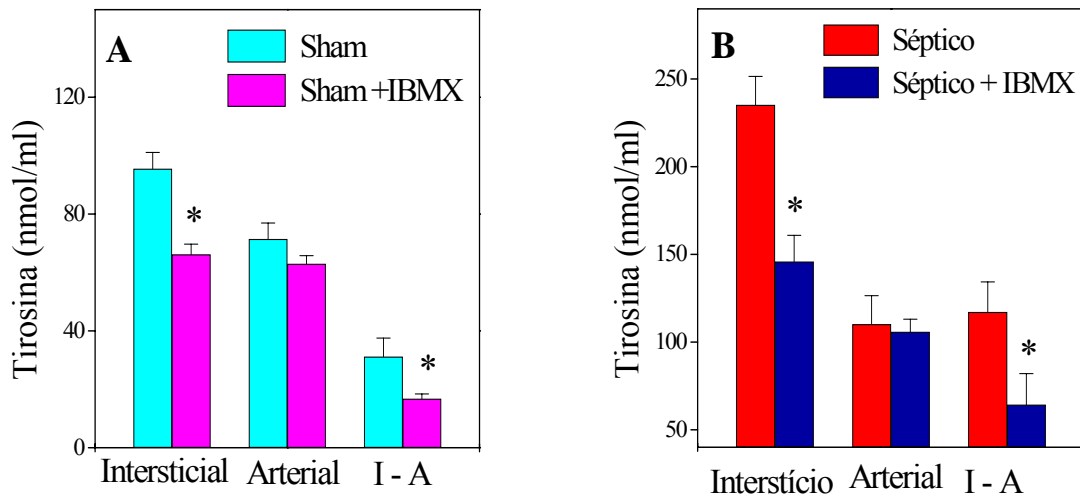


Figura 15. Efeito *in situ* da IBMX (1mM) nas concentrações intersticial (I), arterial (A) e diferença I – A de tirosina em ratos sham (A) e sépticos (B). Os valores são expressos como média \pm EP de 8 ratos; * $p < 0,05$ em relação aos músculos contralaterais não tratados.

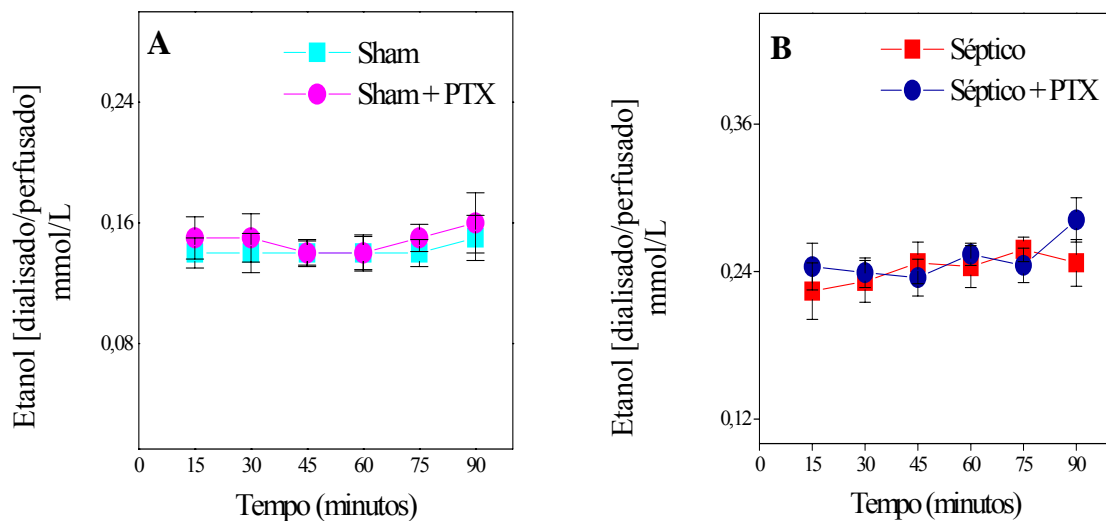


Figura 16. Efeito *in situ* da PTX (1mM) na extração fracional de etanol em músculos de ratos sham (A) e sépticos (B). Os valores são expressos como média \pm EP de 8 ratos.

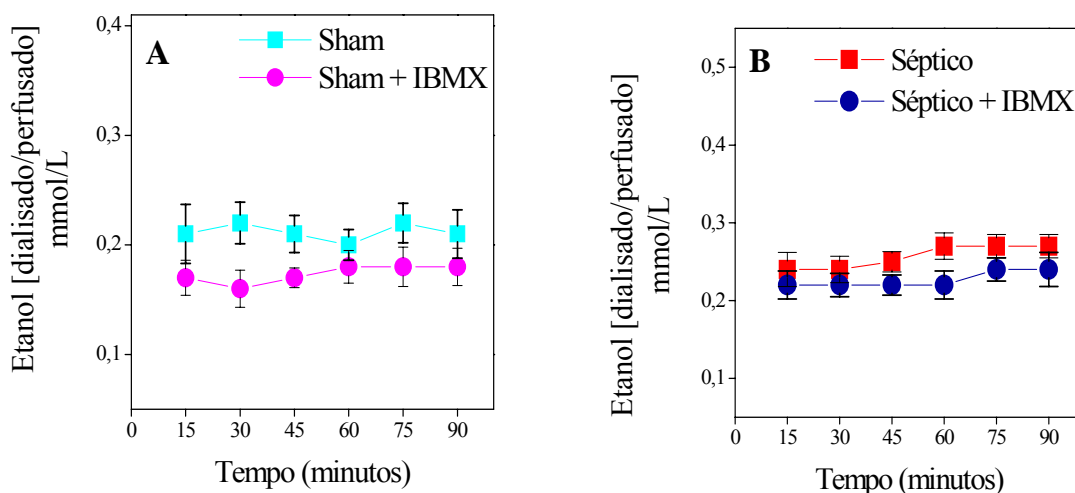


Figura 17. Efeito da *in situ* da IBMX (1mM) na extração fracional de etanol em músculos de ratos sham (A) e sépticos (B). Os valores são expressos como média \pm EP de 8 ratos.

3.5. Efeito *in vitro* da 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX) na degradação total de proteínas em músculos de ratos sham e sépticos.

Foram utilizados músculos EDL de ratos jovens para o estudo do efeito *in vitro* da IBMX na degradação total de proteínas avaliada pela liberação de tirosina. Observou-se um aumento de 18% na degradação total de proteínas em músculos do grupo séptico em relação ao grupo sham (figura 18). A incubação na presença da IBMX (1mM) reduziu em 41% a liberação de tirosina nos músculos contralaterais dos animais sépticos (figura 18).

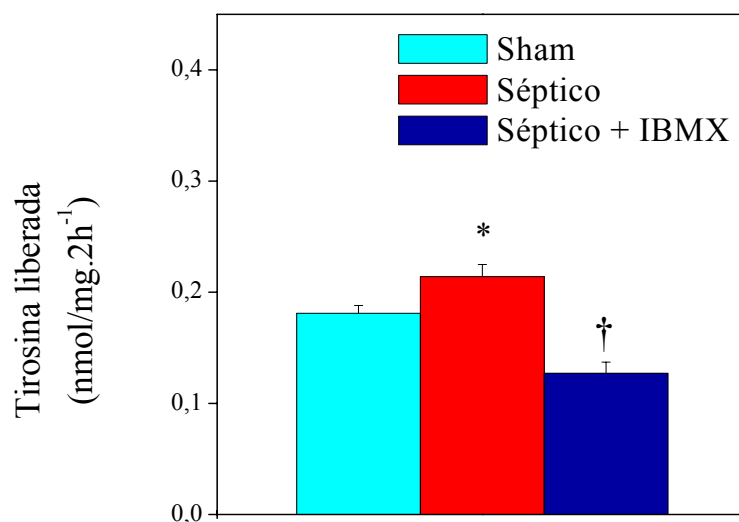


Figura 18. Efeito da sepse experimental de 3 horas e da IBMX (1mM) *in vitro* na degradação total de proteínas musculares. Os valores são expressos como média \pm EP de 8 ratos; * $p < 0,05$, em relação ao grupo sham; † $p < 0,05$; em relação ao grupo séptico não tratado.

4. Discussão.

A atrofia muscular é uma das principais complicações clínicas da sepse que compromete a qualidade de vida dos pacientes. Infelizmente, até o momento, não existe tratamento capaz de preveni-la. Utilizando a microdiálise como uma nova metodologia de estudo do metabolismo protéico *in vivo*, o presente trabalho demonstra o efeito anticatabólico dos derivados de xantina no catabolismo de proteínas em músculos de ratos sépticos.

Para a padronização da microdiálise em nosso laboratório, foram realizados experimentos em músculos de animais normais a fim de se determinar as possíveis interferências metodológicas como, por exemplo, a lesão mecânica causada pela inserção do cateter, o acúmulo de radioativos na membrana e os efeitos indesejados da anestesia prolongada. Nossos resultados mostram que a inserção do cateter de microdiálise no músculo esquelético, durante 3 horas, não causa danos histológicos importantes. A arquitetura das fibras musculares, na sua grande maioria, foi preservada, não sendo observada reação inflamatória local importante (figura 10A e B). Também não houve diferença no conteúdo de glicogênio nos músculos de animais com ou sem cateter, indicando que a lesão mecânica não provoca depleção energética do tecido muscular. Bolinder *et al.*⁽¹⁰⁾ demonstraram que o aumento imediato de ATP no dialisado causado pela inserção do cateter no tecido adiposo de humanos pode ser utilizado como marcador do dano tecidual. Nesses estudos verificou-se que após trinta minutos da inserção do cateter, a concentração de ATP foi reduzida a valores basais, permanecendo assim até o final do experimento. Portanto, podemos sugerir que, em nossas condições experimentais, os efeitos agudos causados pelo trauma do cateter foram transitórios, de

tal forma que o metabolismo celular já estava normalizado, após 30 minutos do período de equilíbrio.

Sabe-se que o processo de difusão entre uma substância presente no interstício e o interior do cateter nunca alcança um equilíbrio perfeito em condições *in vivo*, portanto, é essencial que todo cateter de microdiálise seja calibrado ^(8,12). Para a determinação do valor de recuperação da tirosina intersticial pelo cateter de microdiálise utilizou-se nesse estudo a técnica da referência interna ou retrodiálise. Esta técnica, quando comparada a outras técnicas de calibração *in vivo* como, por exemplo, a calibração por equilíbrio de diferentes concentrações do metabólito, apresenta a grande vantagem de consumir menos tempo. No entanto, sua principal desvantagem é que o valor de recuperação pode ser subestimado devido ao acúmulo de metabólitos radioativos na membrana, como acontece para a [³H]-glicose no tecido adiposo de ratos, após 150 minutos de microdiálise ⁽⁸⁾. De acordo com nossos resultados, o valor percentual médio de recuperação da tirosina intersticial pelo cateter inserido no músculo tibial anterior de ratos normais perfundidos a um fluxo de 1 µl/min foi de 33,5 ± 1,2% (figura 6B). Esses valores foram constantes até 240 minutos de experimentação. A linearidade de resposta observada ao longo de um tempo prolongado de microdiálise demonstra confiabilidade da técnica de calibração utilizada e dos resultados da concentração intersticial obtidos a partir dela, uma vez que não houve acúmulo de [¹⁴C]-tirosina na membrana.

O uso da microdiálise em músculos esqueléticos possibilita que a tirosina se difunda passivamente do interstício para dentro do fluido de perfusão do cateter e assim possa ser quantificada na solução dialisada. A concentração média de tirosina presente no dialisado muscular, quantificada por fluorimetria em nossos estudos, foi de 62,7 ±

1,1 nmol/ml. Este valor está totalmente de acordo com os dados de Rosdahl *et al.* ⁽¹⁵⁾, que utilizaram o HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) como método de análise de aminoácidos no tibial anterior de ratos normais. Embora o HPLC ainda seja o método de análise mais utilizado para a quantificação dos aminoácidos em estudos de microdiálise do SNC e de tecidos periféricos, nossos resultados indicam que o método fluorimétrico descrito por Walkes *et al.* ⁽¹⁷⁾ pode também ser utilizado para a quantificação da tirosina muscular. Entre as vantagens desta técnica em relação ao HPLC podemos citar o seu baixo custo e a facilidade do procedimento. No entanto, a sua baixa sensibilidade quando comparada ao método cromatográfico não permite que a tirosina seja quantificada em volumes de dialisado menores que 50 μ l.

Uma vez conhecido o valor de recuperação de cada cateter, individualmente, torna-se possível corrigir o valor da concentração de tirosina na solução dialisada e a assim obter a verdadeira concentração intersticial. Em todos os experimentos realizados a concentração intersticial de tirosina foi sempre maior que a arterial. Esta diferença permitiu o cálculo da diferença I - A, o que indica que este aminoácido está sendo liberado localmente pela fibra muscular esquelética. Diferenças como estas são também obtidas para outros metabólitos liberados pelas células como o lactato e o glicerol ⁽⁵⁴⁾. Na figura 6A podemos também observar que os valores da concentração intersticial, arterial e a diferença I-A de tirosina em músculos de ratos normais não variaram após 80, 160 ou 240 minutos do início da diálise. Portanto, o traumatismo do tecido causado pela inserção do cateter em nossas condições experimentais não parece interferir com o metabolismo da tirosina como acontece para outros aminoácidos como, por exemplo, a glutamina em músculos de humanos ⁽¹⁾. Para a interpretação correta dos resultados obtidos pela técnica de microdiálise é preciso que se conheça o estado hemodinâmico

do animal. Nesses experimentos iniciais, a PAM foi utilizada como principal parâmetro, a qual manteve-se constante (125 ± 5 mmHg) ao longo de todo período estudado, indicando que os animais estavam hemodinamicamente estáveis, apesar do longo período de anestesia. De acordo com nossos resultados, a concentração intersticial média de tirosina no músculo tibial anterior de ratos normais foi de $90,0 \pm 3,8$ nmol/ml. Para a confirmação desses valores obtidos com a técnica da referência interna a um fluxo de perfusão de $1 \mu\text{l}/\text{min}$, um grupo separado de músculos de animais normais foram perfundidos a um fluxo de $0,3 \mu\text{l}/\text{min}$. É sabido que nestas condições de baixo fluxo, a difusão do metabólito alcança o equilíbrio perfeito, isto é, a recuperação de sua concentração intersticial pelo cateter é de 100%, não existindo, portanto, a necessidade da calibração do mesmo ^(13, 54). Assim, a concentração de tirosina obtida no dialisado reflete diretamente a sua concentração no interstício. Nesses experimentos, a concentração final de tirosina no dialisado e, conseqüentemente no interstício, foi de $82,5 \pm 3,1$ nmol/ml. Esse valor não é estatisticamente diferente daquele obtido utilizando a referência interna como método de calibração. Valores aproximados a estes foram também encontrados em músculos *vastus lateralis* de humanos (69 ± 5 nmol/ml) perfundidos a um baixo fluxo ⁽¹⁾. Embora experimentos de microdiálise com baixo fluxo de perfusão apresentem a vantagem de não utilizarem radioativos na determinação do fator de recuperação do cateter, são experimentos de longa duração, gerando como principal inconveniente à necessidade de um tempo prolongado de anestesia dos animais.

O modelo da sepse experimental.

Uma vez padronizada a técnica de microdiálise em músculos esqueléticos de ratos normais, passamos a utilizá-la para investigar as alterações *in situ* do metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos sépticos induzidos pela CLP. A sepse foi utilizada como modelo de catabolismo muscular por sua grande relevância clínica, haja vista ser uma das principais causas de morte de pacientes internados em unidades de terapia intensiva ^(34,41). Dentre os diferentes modelos de sepse experimental conhecidos, a manobra da CLP é a que melhor reproduz em animais o quadro clínico observado em pacientes humanos, permitindo estudar as alterações fisiopatológicas da sepse grave ⁽⁵⁶⁾. Em nosso trabalho foi avaliado o efeito temporal da sepse (após 3, 6 e 10 horas da CLP) no metabolismo de proteínas na musculatura esquelética de ratos. Para isso, foi necessário, inicialmente, o conhecimento do estado geral, nutricional e metabólico do animal séptico. Na sepse de 6 e 10 horas a mortalidade foi bastante elevada (dados não mostrados), certamente em razão da disfunção múltipla de órgãos que acontece nas fases avançadas da doença. Embora se esperasse um aumento da temperatura corporal resultante do processo infeccioso, o qual foi confirmado pela hemocultura e pelos achados de secreção purulenta no abdômen *post-mortem*, constatou-se uma redução de 1,2°C na temperatura dos animais que foram estudados após 10 horas da CLP. Essa queda na temperatura está provavelmente associada ao estado de choque nesses animais ⁽⁵⁶⁾.

Os ratos sépticos tiveram um ganho ponderal de quase cinco vezes em relação ao grupo sham, após 10 horas da cirurgia. Esse ganho não está relacionado à ingestão alimentar ou ao aumento de massa corporal, mas a redução grave do volume urinário. A

antidiurese decorrente da ação renal da vasopressina e a polidipsia em animais sépticos fazem parte de mecanismos compensatórios restauradores da pressão arterial ⁽³⁶⁾. De fato, a PAM foi reduzida após 3, 6 e 10 horas de sepse (figura 8), muito provavelmente pelo extravasamento de líquido do compartimento intravascular para o intersticial. É bem conhecido que durante a fase aguda da sepse há aumento do débito cardíaco, redução da resistência vascular periférica e aumento da permeabilidade capilar, determinando uma redução no volume circulante efetivo e hipotensão ^(28,36,41).

Em animais com três horas de infecção observou-se um aumento de 73% na uréia plasmática, indicativo de perda da função renal e, possivelmente do aumento do catabolismo protéico. Estes dados estão de acordo com os estudos de Haybron *et al.* ⁽⁵⁷⁾ que demonstraram um comprometimento da função renal em ratos sépticos com redução da taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo efetivo renal. Foi também verificado no grupo séptico após 3 horas um decréscimo do conteúdo de glicogênio hepático (86%) e muscular (60%), muito provavelmente devido à ação de hormônios como o glucagon e a adrenalina, que sabidamente encontram-se elevados nessa situação, promovendo ativação da enzima glicogênio fosforilase e inibição da glicogênio sintase no fígado ^(41,58). As altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias podem também ter contribuído para estes efeitos, particularmente o TNF α que induz um estado de resistência à insulina, reduzindo o armazenamento de glicose sob a forma de glicogênio no fígado e no músculo ⁽⁵⁹⁾. A depleção do glicogênio nos animais sépticos foi acompanhada por glicemia normal e hiperlactacidemia indicando uma maior utilização periférica de glicose e ativação da via glicolítica ⁽⁶⁰⁾. O aumento da concentração plasmática de ácido lático pode explicar o quadro de acidose metabólica observada nos animais sépticos. O pH normal observado em 3 horas de sepse foi,

provavelmente, resultado do tamponamento do excesso de ácidos pelo bicarbonato e da compensação respiratória que levou à redução da PCO_2 , caracterizando assim o distúrbio do equilíbrio ácido-básico típico do estado séptico agudo (tabela 1). É bem estabelecido que o desvio do metabolismo aeróbico para o anaeróbico no estado séptico é decorrente da hipoperfusão tecidual ⁽⁶⁰⁾. Embora a PO_2 não tenha sido alterada nesses animais, muito provavelmente pela compensação respiratória, a PAM foi reduzida em 18% em relação ao grupo sham. Embora alguns estudos relatem que são necessárias alterações da ordem de 40 mmHg na pressão arterial para ocorrer o comprometimento da microcirculação ⁽⁶¹⁾, observou-se uma redução no FSM nos tempos finais de microdiálise em músculos de animais com 3 horas de sepse. Estes dados estão de acordo com os estudos que mostram redução na densidade capilar e do fluxo sanguíneo em músculo EDL de ratos sépticos, onde se acredita haver uma redução na capacidade de deformação dos eritrócitos, gerando um aumento no número de capilares com fluxo interrompido ou intermitente ⁽⁶²⁾. Especula-se também que os leucócitos ativados em situações inflamatórias, como a sepse, sejam os principais responsáveis pela injúria do endotélio capilar. Estas células se depositariam, agudamente, nos capilares pós-venosos em diferentes tecidos, entre eles o músculo esquelético, criando assim uma barreira física à circulação sanguínea ⁽⁶³⁾.

Catabolismo protéico muscular induzido pela sepse.

Em todos os períodos de sepse estudados, verificou-se um aumento na concentração intersticial de tirosina muscular que variou em média 153% em relação aos controles (figuras 7), sendo a maior resposta catabólica observada no grupo de 6

horas. Isto foi provavelmente decorrente do estresse, uma vez que estes animais, ao contrário dos demais, receberam duas anestésias em um curto período de tempo. O aumento da diferença I-A de tirosina observada nos diferentes grupos de ratos sépticos indica que a elevação da concentração deste aminoácido no interstício não foi decorrente do maior influxo arterial proveniente de outras fontes como o intestino, fígado, outros músculos e tecidos. Considerando que a tirosina não é metabolizada e nem sintetizada “de novo” pela fibra muscular, todo aumento na concentração da tirosina no interstício muscular reflete uma mudança do balanço protéico em direção ao catabolismo, ou seja, ao aumento da degradação acompanhada, ou não, de redução de síntese protéica ⁽³⁾. Atualmente, acredita-se que o aumento da degradação de proteínas seja o principal mecanismo fisiopatológico responsável pela perda de massa muscular em diferentes situações catabólicas incluindo a sepse ⁽⁶⁴⁾. De fato, nossos resultados *in vitro* demonstram um aumento da atividade proteolítica (18%) em músculos de ratos sépticos em relação a seus controles (figura 18). Williams *et al.* ⁽⁴⁴⁾ descreveram um aumento da expressão gênica de proteases dependentes de cálcio em músculos de ratos 16 horas após a CLP, sendo esta resposta atenuada por drogas que bloqueiam o aumento do cálcio citosólico ⁽³⁸⁾. Por outro lado, Hobler *et al.* ⁽⁴⁰⁾ observaram redução da degradação de proteínas em músculos EDL de ratos sépticos incubados na presença de inibidores da via ATP-ubiquitina-proteassoma. Baseado nesse conjunto de dados é possível sugerir que o aumento *in situ* da tirosina no músculo tibial anterior demonstrado no presente trabalho seja decorrente da hiperativação de vias proteolíticas como a dependente de cálcio e/ou dependente de ATP-ubiquitina-proteassoma.

Considerando que toda alteração da microcirculação pode modificar a concentração intersticial dos metabólitos, não se pode descartar a possibilidade de que o

aumento da tirosina observado no interstício muscular dos animais sépticos (figura 7A) tenha sido superestimado em função da redução do FSM (figura 9). No caso de substâncias que são liberadas pelas células musculares como a tirosina, sua concentração no interstício pode ser aumentada não apenas por um efeito metabólico, mas também pela redução do seu *clearance* resultante da redução do fluxo local ⁽⁵¹⁾.

As citocinas pró-inflamatórias como o TNF α , a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6) são sintetizadas por células imunes ativadas em resposta à infecção bacteriana. Mais recentemente, tem-se demonstrado que tecidos como o músculo esquelético e o cardíaco podem também sintetizar citocinas, cujo papel fisiológico *in situ* ainda é desconhecido ⁽⁶⁵⁾. Dentre estas, o TNF α parece ser o principal mediador da ativação da proteólise muscular no estado séptico em homens e animais experimentais ⁽³⁰⁾. Em roedores, o pico máximo da concentração plasmática e da expressão do RNA mensageiro desta citocina no músculo gastrocnêmio acontece 2 horas após a endotoxemia, retornando para valores basais após este período ^(65,66). Este perfil de secreção do TNF α na sepse sugere que esta citocina possa estar envolvida com o aumento da concentração intersticial de tirosina observada no grupo séptico de 3 horas (figura 7A). No entanto, a manutenção da resposta catabólica observada no grupo de 10 horas sugere que outros fatores endógenos, além do TNF α , sejam responsáveis pela ativação da proteólise muscular. Esta hipótese é reforçada por estudos *in vitro* que mostram que a ação proteolítica muscular do TNF α não é direta, uma vez que a incubação de músculos soleus de ratos jovens na presença dessa citocina não resulta em aumento da velocidade de degradação de proteínas ⁽⁶⁷⁾. Diferentes trabalhos têm demonstrado o importante papel dos glicocorticóides como ativadores das vias proteolíticas no estado séptico. Músculos EDL de ratos sépticos tratados com

bloqueadores de glicocorticóides apresentam uma redução na expressão gênica das enzimas regulatórias do sistema proteolítico ATP-ubiquitina-proteassoma⁽³⁹⁾. Além do TNF α e dos glicocorticóides, outros mecanismos podem também ser responsáveis pela ativação da proteólise muscular na sepse como, por exemplo, a acidose metabólica⁽⁶⁰⁾, outras citocinas^(26,30) e ainda a redução de nutrientes em função do prejuízo na microcirculação⁽⁶²⁾.

Ação anticatabólica dos derivados de xantinas na sepse

Os efeitos dos derivados de xantinas no catabolismo protéico muscular foram investigados apenas no grupo séptico de 3 horas, em razão deste modelo experimental não necessitar de duas anestésias e apresentar a menor mortalidade quando comparado aos grupos de 6 e 10 horas. Além disso, é um excelente modelo agudo de catabolismo protéico que não é acompanhado por alterações da massa muscular esquelética (dados não mostrados).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o tratamento sistêmico com PTX, um derivado de xantina que inibe a síntese do TNF α , atenua a perda de proteínas musculares em ratos sépticos (figura 11B). A redução da concentração intersticial e da diferença I-A de tirosina muscular em ratos tratados com PTX, durante a primeira hora de sepse, sugere que o TNF α possa realmente estar envolvido com a estimulação aguda do catabolismo de proteínas musculares em nosso modelo experimental. Diferentes estudos têm demonstrado o efeito anti-TNF α das metilxantinas. Vary *et al.*⁽³¹⁾ demonstraram que a administração de PTX reduz em 98% as concentrações plasmáticas dessa citocina e, conseqüentemente, melhora a ação

anticatabólica da insulina no metabolismo de proteínas em ratos sépticos. Acredita-se que a inibição do $\text{TNF}\alpha$ seja o principal mecanismo pelo qual a PTX previne a perda de massa muscular em situações como o câncer ^(24,68) e a sepse ⁽³¹⁾. Todavia isto não explica os efeitos benéficos do tratamento com inibidores da fosfodiesterase do AMPc em situações patológicas, onde a atrofia muscular ocorre independentemente da ação das citocinas inflamatórias como, por exemplo, na desnervação atrófica ^(21,69). Interessante observar que os efeitos anticatabólicos da PTX observados aqui representaram uma ação na fibra muscular, uma vez que a concentração arterial de tirosina, aumentada no grupo séptico, não foi alterada pela droga (figura 11B). Estes dados estão de acordo com outros estudos que mostram a inibição da proteólise dependente de ATP-ubiquitina-proteassoma em músculos de ratos sépticos ou com câncer ⁽²⁴⁾ tratados com injeções diárias de PTX e com outros derivados de xantina como a torbafilina ⁽⁶⁸⁾.

É sabido que a PTX também exerce ações hemodinâmicas importantes, melhorando o trabalho cardíaco, reduzindo a viscosidade sangüínea e facilitando a deformidade do eritrócito ⁽⁷⁰⁾. Em razão disto, o tratamento com PTX aumenta a oferta e extração do oxigênio pelos tecidos e dessa maneira contribui para a sobrevivência de ratos sépticos ^(25,28). Embora o presente trabalho demonstre que a administração sistêmica de PTX não previne a queda da PAM e do FSM nos ratos sépticos, é possível sugerir que o efeito anticatabólico da pentoxifilina no metabolismo protéico possa ter sido mediado não somente pela redução dos níveis circulantes do $\text{TNF}\alpha$, mas também pela preservação da perfusão tecidual e a manutenção do metabolismo oxidativo no músculo esquelético.

Navegantes *et al.* ⁽³²⁾ demonstraram que os derivados de xantina *in vitro* podem também exercer ações antiproteolíticas diretas no músculo esquelético, muito provavelmente por promoverem o aumento do conteúdo intracelular do AMPc. Para a investigação dos efeitos *in situ* dos derivados de xantina no metabolismo protéico, músculos de ratos sham e sépticos foram perfundidos com IBMX ou PTX (1mM), na mesma concentração utilizada *in vitro* ⁽²³⁾. A IBMX *in situ* reduziu a concentração intersticial e a diferença I-A de tirosina tanto no grupo séptico como no grupo sham. Ao contrário da ação local da IBMX (figura 15), a PTX sistêmica ou *in situ* não alterou a concentração intersticial de tirosina em músculos de ratos sham (figura 14). Isto sugere que a ação anticatabólica muscular da PTX seja realmente indireta, via inibição do TNF α circulante, o qual estaria em concentrações elevadas apenas no grupo séptico.

Os efeitos anticatabólicos da IBMX ocorreram independentemente de alterações hemodinâmicas, uma vez que o FSM não foi alterado (figura 17). Resultados semelhantes foram obtidos em músculos esqueléticos de humanos perfundidos com inibidores seletivos da fosfodiesterase do AMPc ⁽²²⁾. É possível sugerir que pelo menos parte dos efeitos metabólicos da IBMX observados no presente trabalho tenha sido indireto, resultante de sua ação anti-TNF α no músculo *in situ*. No entanto, esta hipótese não parece provável uma vez que, pela análise histológica dos músculos de ratos sépticos, não foi observado infiltrado inflamatório diferente dos músculos controles (figuras 10C e D). Hinkle *et al.* ⁽²¹⁾ demonstraram, recentemente, o efeito anticatabólico do tratamento *in vivo* com inibidor seletivo da fosfodiesterase do tipo 4 em dois modelos experimentais de atrofia muscular (desnervação atrófica e desuso) cujo mecanismo não envolve citocinas. Além disso, nossos resultados *in vitro* demonstram claramente que a IBMX (1mM) age diretamente no músculo esquelético de ratos

normais ou sépticos reduzindo a proteólise (figura 18). Baseado neste conjunto de dados, e em resultados semelhantes obtidos com drogas que aumentam o conteúdo de AMPc no músculo como os agonistas beta-2 adrenérgicos ^(71;72) é possível sugerir a existência de um mecanismo de fosforilação inibitório desencadeado pela ativação do AMPc na regulação das vias proteolíticas no músculo esquelético. Embora os eventos moleculares relacionados com esse mecanismo ainda não sejam conhecidos, resultados anteriores de nosso laboratório sugerem a participação das proteases dependentes de cálcio e dependentes de ATP-ubiquitina-proteassoma como alvos de ação do AMPc. As atividades proteolíticas e a expressão gênica de diferentes componentes desses sistemas são reduzidas em músculos de ratos normais incubados na presença de dibutyryl AMPc (1mM), um análogo sintético do AMPc e também da IBMX ⁽⁷²⁾. Em futuros experimentos, seria extremamente interessante investigar a ação antiproteolítica desses compostos em músculos esqueléticos de ratos sépticos.

Em resumo, foi demonstrado no presente trabalho que o tratamento com derivados de xantinas reduz a perda de proteínas musculares em um modelo experimental de sepse aguda. O conhecimento mais detalhado dos mecanismos relacionados com a ação dessas drogas pode contribuir futuramente para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes na prevenção perda de massa muscular na sepse e também em diferentes situações clínicas como, por exemplo, câncer, SIDA, imobilização prolongada, desnervação motora, distrofias, hipertireoidismo, síndrome de Cushing, etc.

5. Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

1. A técnica de microdiálise da musculatura esquelética é perfeitamente viável para a investigação *in situ* do metabolismo de proteínas em situações fisiológicas e patológicas, como a sepse;
2. A sepse aguda induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP) em ratos é um modelo experimental que reproduz com fidelidade o quadro clínico observado em humanos, sendo bastante apropriado para se estudar o catabolismo protéico na musculatura esquelética em tempos curtos de infecção;
3. Os derivados de xantina não alteram o fluxo sanguíneo muscular, mas reduzem o catabolismo de proteínas na musculatura esquelética de ratos normais ou sépticos por diferentes mecanismos;
4. O efeito anticatabólico da administração sistêmica da pentoxifilina no metabolismo protéico parece ser indireto, muito provavelmente mediado pela inibição das citocinas pró-inflamatórias como o TNF α ;
5. O efeito anticatabólico da IBMX é resultante de sua ação antiproteolítica, exercida diretamente no músculo esquelético de ratos normais e sépticos.

6. Referências Bibliográficas

- 1 Gutierrez A, Anderstam B, Alvestrand A. Amino acid concentration in the interstitium of human skeletal muscle: a microdialysis study. *Eur J Clin Investig* 1999;29:947-52.
- 2 Kettelhut IC. Regulação da degradação de proteínas em músculo esquelético [Tese de livre docência]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo FMRP/USP; 1994.
- 3 Kettelhut IC, Wing SS, Goldberg AL. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. *Diabetes Metab Rev* 1988;4 (8):751-72.
- 4 Jefferson LS, Kimball SR. Translational control of protein synthesis: implications for understanding changes in skeletal muscle mass. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2001;11:143-49.
- 5 Jagoe RT, Goldberg AL. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001;4:183-90.
- 6 Mantle D, Preedy VR. Adverse and beneficial functions of proteolytic enzymes in skeletal muscle, an overview. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 2002;21:31-49.
- 7 De la Peña A, Liu P, Derendorf H. Microdialysis in peripheral tissues. *Adv Drug Del Rev* 2000;45:189-216.
- 8 Lönnroth P, Strindberg L. Validation of the internal reference technique for calibrating microdialysis catheters *in situ*. *Acta Physiol Scand* 1995;153:375-80.
- 9 Bito L, Davson H, Levin EM, Murrey M, Snider N. The concentration of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid *in vivo* dialysate of brain

- and blood plasma of the dog. *J Neurochem* 1966;13:1057-67.
- 10 Arner P, Bolinder J. Microdialysis of adipose tissue. *J Intern Med* 1991;230(4):381-86.
- 11 Hamberger A, Jacobson I, Nyström M, Sanderg M. Microdialysis sampling of the neuronal environment in basic and clinical research. *J Intern Med* 1991;230:375-80.
- 12 Ungerstedt U. Microdialysis – principles and applications for studies in animals and man. *J Internal Medicine* 1991;365-73.
- 13 Henriksson J. Microdialysis of skeletal muscle at rest. *Proc Nutr Soc* 1999;58:919-23.
- 14 Müller M. Microdialysis. *BJM* 2002;324 (9):588-91.
- 15 Rosdahl H, Samuelsson AC, Ungerstedt U. Influence of adrenergic agonists on the release of amino acids from rat skeletal muscle studied by microdialysis. *Acta Physiol Scand* 1998;163:349-60.
- 16 Binnert C, Tappy L. Microdialysis in the intensive care unit: a novel tool for clinical investigation or monitoring? *Cur Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:185-88.
- 17 Waalkes TP, Uderfriend SA. A fluorimetric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissue. *J Lab Clin Med* 1957;50:733-736.
- 18 Fulks R, Li JB, Goldberg AL. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J Biol Chem* 1975;250:290-98.
- 19 Lönnroth P. Microdialysis in adipose tissue and skeletal muscle. *Horm Metab Res* 1997;29:344-46.
- 20 Rall TW. Drugs used in the treatment of asthma. In: Goodman LS, Gilman AG,

- Editores. The pharmacological basis of therapeutics. 7^{ed}. New York: Pergamon press; 1991. p.619-37.
- 21 Hinkle RT, Dolan E, Cody DB, Bauer MB, Isfort RJ. Phosphodiesterase 4 inhibition reduces skeletal muscle atrophy. *Muscle nerve* 2005 Dec;32:775-81.
- 22 Enoksson S, Degerman E, Hagström-Toft E, Large V, Arner P. Various phosphodiesterase subtypes mediate the in vivo antilipolytic effect of insulin on adipose tissue and skeletal muscle in man. *Diabetologia* 1998;41:560-68.
- 23 Navegantes LCC, Machado CR, Resano NM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Beta2-agonists and cAMP inhibit protein degradation in isolated chick (*Gallus domesticus*) skeletal muscle. *Br Poult Sci* 2003;44 (1):149-54.
- 24 Costelli P, Bossola M, Muscaritoli M, Grieco G, Bonelli G, Bellantone R et al. Anticytokine treatment prevents the increase in the activity of ATP-ubiquitin- and Ca²⁺-dependent proteolytic systems in the muscle of tumour-bearing rats. *Cytokine* 2002 July;19 (1):1-5.
- 25 Wu CC, Liao MH, Chen SJ, Yen MH. Pentoxifylline improves circulatory failure and survival in murine models of endotoxaemia. *Eur J Pharmacol* 1999;373:41-49.
- 26 Michetti C, Coimbra R, Hoyt DB, Loomis W, Junger W, Wolf P. Pentoxifylline reduces acute lung injury in chronic endotoxemia. *J Surg Res* 2003;115:92-99.
- 27 Steeb GD, Wilson MA, Garrison RN. Pentoxifylline preserves small intestine microvascular blood flow during bacteremia. *Surgery* 1992;112:756-63.
- 28 Yang S, Zhou M, Koo DJ, Chaudry IH, Wang P. Pentoxifylline prevents the transition from hyperdynamic to hypodynamic response during sepsis. *Am J Physiol* 1999;277:1036-44.

- 29 Liang L, Beshay E, Prud'homme GJ. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes* 1998;47:571-75.
- 30 Sharma R, Anker SD. Cytokines, apoptosis and cachexia: the potential for TNF antagonism. *Inter J Cardiol* 2002;85:161-71.
- 31 Vary T, Dardevet D, Grizard J, Voisin L, Buffiere C, Denis P, *et al.* Pentoxifylline improves insulin action limiting skeletal muscle catabolism after infection. *J Endocrinol* 1999;163:15-24.
- 32 Navegantes LCC, Resano NM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000 Sep;279 (3):663-8.
- 33 Breuille D, Voisin L, Contrepois M, Arnal M, Rose R, Obled C. A sustained rat model for studying the long-lasting catabolic state of sepsis. *Infect Immun* 1999 Mar;67:1079-85.
- 34 Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001;29 (7):109-15.
- 35 Silva E, Pedro MA, Sogayar ACB, Mohovic T, Silva CLO, Janiszewski M, *et al.* Brazilian Sepsis Epidemiological study (BASES study). *Crit Care*. 2004;8 (4):251-60.
- 36 Silva E, Othero J, Sogayar ACB. Consenso Brasileiro de Sepse. 2003; <http://www.einstein.br/sepse/pdf/2.htm>
- 37 Hart DW, Gore DC, Rinehart AM, Asimakis GK, Chinkes DL. Sepsis-induced failure of hepatic energy metabolism. *J Surg Res*. 2003;115:139-47.
- 38 Fischer DR, Sun X, Williams AB, Gang G, Pritts TA, James JH, *et al.* Dantrolene

- reduces serum TNF α and corticosterone levels and muscle calcium, calpain gene expression and protein breakdown in septic rats. *Shock* 2001;15 (3):200-07.
- 39 Sun X, Mammen JMV, Tian X. Sepsis induces the transcription of the glucocorticoid receptor in skeletal muscle cells. *Clin Sci (Lond)* 2003;105:383-91.
- 40 Hobler SC, Tiao G, Fischer JE, Monaco J, Hasselgren PO. Sepsis-induced increase in muscle proteolysis is blocked by specific proteasome inhibitors. *Am J Physiol* 274:1998;30-7.
- 41 Pedersen PV, Warner BW, Bjornson HS, Hiyama DT, Li S, Rigel DF, et al. Hemodynamic and metabolic alterations during experimental sepsis in young and adult rats. *Surg. Gynecol Obstet* 1989;168:148-56.
- 42 Chioléro R, Revelly HP, Tappy L. Energy metabolism in sepsis and injury. *Nutrition* 1997;13 (9): 45-1.
- 43 Maitra SR, Wojnar MM, Lang CH. Alterations in tissue glucose uptake during the hyperglycemic and hypoglycemic phases of sepsis. *Shock* 2000 May;13 (5):379-85.
- 44 Williams AB, Decourten-Myers GM, Fischer JE, Luo G, Sun X, Hasselgren PO. Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. *FASEB* 1999; 13: 1435-43.
- 45 Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock – a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980;29:189-01.
- 46 Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis : lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 2000;13 (2):110-16.

- 47 Clowes GHA, Zuschneid W, Turner M, Blackburn G, Rubin J, Toala P, et al. Observations on the pathogenesis of the pneumonitis associated with severe infection in other parts of the body. *Ann Surg* 1968;167:630-50.
- 48 Lönnroth P, Smith U. Microdialysis - a novel technique for clinical investigations. *J Intern Med* 1990 May;227 (5):295-300.
- 49 Sjörgren B, Noerdenskjöld T, Holmgeen H, Möllerström J. Beitrag zur Kenntnis der Leberhythmik (glykogen, Phosphor und Calcium in der Kaninchenleber). *Pfügers Arch Ges Physiol* 1938;240:427-36.
- 50 Carrol NV, Longlay RW, Roe JH. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J Biol Chem* 1956;220:583-93.
- 51 Hickner RC, Rosdahl H, Borg L, Ungerstedt U, Jorfeldt L, Henriksson J. The ethanol technique of monitoring local blood flow changes in rat skeletal muscle: implications for microdialysis. *Acta Physiol Scand* 1992;176:87-97.
- 52 Jefferson LS, Li JB, Rannels SR. Regulation by insulin of amino acid release and protein turnover in the perfused rat hemicorpus. *J Biol Chem* 1977;252:1476-83.
- 53 Jansson PA, Smith U, Lönnroth P. Interstitial glycerol concentration measured by microdialysis in two subcutaneous regions in humans. *Am J Physiol* 1990 Jun;258 (6):E918-22.
- 54 Quisth V, Enoksson E, Blaak E, Hagström-Toft P, Arner P, Bolinder J. Major differences in noradrenaline action on lipolysis and blood flow rates in skeletal muscle and adipose tissue in vivo. *Diabetologia* 2005 May;48 (5):946-53.
- 55 Backer CC, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 1983 Aug;94 (2):331-35.

- 56 Kettelhut IC, Fiers W, Goldberg AL. The toxic effects of tumor necrosis factor *in vivo* and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:4273-4277.
- 57 Haybron DM, Townsend MC, Hampton WW, Schinner WJ, Schirmer JM, Fry DE. Alterations in renal perfusion and renal energy charge in murine peritonitis. *Arch Surg* 1987;122:328-31.
- 58 Buday AZ, Lang CH, Bagby GJ, Spitzer JJ. Glycogen synthase and phosphorylase activities during glycogen repletion in endotoxemic rats. *Circ Shock* 1986;19:149-63.
- 59 Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ. Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology* 1992;130:43-52.
- 60 Levy B, Gibot S, Franck P, Cravoisy A, Bollaert PE. Relation between muscle $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ activity and raised lactate concentrations in septic shock: a prospective study. *Mechan diseases* 2005 March;365 (5):871-75.
- 61 Tyml K, Budreau CH. Effect of isovolemic hemodilution on microvascular perfusion in rat skeletal muscle during low flow state. *Int J Microcirc Clin Exp* 1992;11:433-42.
62. Armour J, Tyml K, Lidington D, Wilson JX. Ascorbate prevents microvascular dysfunction in the skeletal muscle of the septic rat. *J Appl Physiol* 2001;90:795-803.
- 63 Piper RD, Pitt-Hyde ML, Anderson LA, Sibbald WJ, Rife F. Leukocyte activation and flow behavior in rat skeletal muscle in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:129-34.

- 64 Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nature* 2003 Feb;5:87-90.
- 65 Lang CH, Silvis C, Deshpande N, Nystrom G, Frost RA. Endotoxin stimulates in vivo expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. *Shock* 2003;19:538-46.
- 66 Villa P, Sartor G, Angelini M, Sironi M, Conni M, Gnocchi P, et al. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995 Sept;2 (5):549-53.
- 67 Kettelhut IC, Goldberg AL. Tumor necrosis factor can induce fever in rats without activating protein breakdown in muscle or lipolysis in adipose tissue. *J Clin Invest* 1988 May;81:1384-89.
- 68 Combaret L, Tilignac T, Claustrte A, Voisin L, Taillandier D, Obled C. et al. Torbafylline (HWA 448) inhibits enhanced skeletal muscle ubiquitin-proteasoma-dependent proteolysis in cancer and septic rats. *Biochem J* 2002;361:185-192.
- 69 Medina R, Wing SS, Goldberg AL. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *Biochem J* 1995;307:631-37.
- 70 Hotchkiss RS, Karl IE. Pentoxifylline and modulation of the inflammatory response. *Crit Care Med* 1998;26:427-28.
- 71 Costelli P, Garcia-Martinez C, Liovera M, Carbó N, López-Soriano FJ, Agell N et al. Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a

β_2 -adrenergic agonist (clenbuterol). J Clin Invest 1995 May;95:2367-72.

- 72 Navegantes LCC. Mecanismos intracelulares envolvidos com a ação anabólica das catecolaminas no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de ratos [Tese de doutorado].Ribeirão Preto (SP): Faculdade de medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2002.