UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Efeitos da inibição do complexo enzimático NADPH oxidase nas adaptações do estado redox e da função contrátil do músculo esquelético induzidas pelo treinamento físico em ratos.

Fátima Lúcia Rodrigues Guimarães

São Paulo
2015

FÁTIMA LÚCIA RODRIGUES GUIMARÃES

Efeitos da inibição do complexo enzimático NADPH oxidase nas adaptações do estado redox e da função contrátil do músculo esquelético induzidas pelo treinamento físico em ratos

VERSÃO CORRIGIDA

(versão original disponível no Serviço de Biblioteca)

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biodinâmica do Movimento Humano

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rizzo Ramires

São Paulo

2015

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autora: GUIMARÃES, Fátima Lúcia Rodrigues

Título: Efeitos da inibição do complexo enzimático NADPH oxidase nas adaptações do estado redox e da função contrátil do músculo esquelético induzidas pelo treinamento físico em ratos.

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho a minha mãe, porque sei que essa conquista também é dela, ao meu pai, por me ensinar a nunca desistir, e a meus irmãos, porque essa vitória é nossa.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Paulo Ramires, pela oportunidade de ingressar no meio científico, pela paciência durante todo meu processo de ensino aprendizagem, por respeitar o meu tempo, pelo exemplo de ética profissional e pela amizade.

Às professoras Patrícia Brum e Edilamar Oliveira, por todo apoio em paralelo no meu projeto e em minha vida acadêmica.

Aos meus pais (Vanildo e M^a de Lourdes), por todo esforço que fizeram para que eu tivesse a melhor formação, por me apoiarem no que seria importante para mim e não para os olhos dos outros, por me ensinarem a não deixar ninguém passar um risco vermelho na minha história, por estarem presentes mesmo que distantes, enfim, por me amarem.

Aos meus irmãos Sérgio e Vanildo Jr., por torcerem por mim, por me apoiarem nos momentos difíceis, pela companhia.

Às minhas tias, tios, primos e primas que tanto torceram por mim, pela união de vocês para me ajudar nesta etapa da minha vida, pela consideração e pelo carinho de sempre.

Aos meus colaboradores diretos e indiretos, (Aline, Nathalie, Will, Telma, Fernanda, Bianco, Chris, Janaína, Larissa, Paulo, Clara, Bozi, Max, Vanessa, Dani, Guga, Vander, Tiago, Mila, Thulio, Kátia, André, João, Fabi...), pelo trabalho em conjunto, por toda aprendizagem com vocês, pelas risadas, pelas pizzas entre um rato e outro e pelas amizades.

À Marcele que é mais que técnica de laboratório pra mim e a minha amiga Cinthya, por toda ajuda neste trabalho mas principalmente pela amizade de vocês, confiança, conselhos, puxões de orelha, brincadeiras...

Aos técnicos de laboratório (Ney, Katt, Úrsula Urías, Glória, Luciano), pelas ajudas essenciais para o desenvolvimento deste estudo.

Ao meu super colaborador Luiz Bechara, por ser meu exemplo acadêmico, por todos os ensinamentos e pela disposição para ajudar.

Ao professor Francisco Laurindo e aos amigos do Laboratório de Biologia Vascular, por dividirem e permitirem o uso de um espaço na bancada de vocês, por toda disposição para ajudar, por todas as amizades que nasceram dessa convivência.

Aos "super-heróis" da Secretaria de Pós graduação, da Informática e da Biblioteca da Escola de Educação Física e Esporte, pela prontidão em ajudar sempre.

Ao Gustavo Borges e Academia Gustavo Borges, por facilitarem meus horários de trabalho para que eu pudesse estudar, e pelo apoio no início do mestrado.

"A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez"

George Bernard Shaw

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AKT/PKB	Proteína quinase B
APO	Apocinina
AS	Apocinina sedentário
AST	Área de secção transversa
AT	Apocinina treinado
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CM	Contração muscular
CS	Controle sedentário
CT	Controle treinado
DHPR	Receptores dihidropiridina
EDL	Extensor longo dos dedos
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD ⁺	Flavina adenina dinucleotídeo oxidada
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
F _{esp.}	Força isométrica específica
F _{máx}	Força isométrica máxima
F _{máx esp.}	Força isométrica máxima específica
FM	Fadiga muscular
FxF	Força em função da frequência de estimulação
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCL	Hipoclorito
MC	Massa corporal
ΔMC	Delta massa corporal
ME	Músculo esquelético

MLC	Miosina de cadeia leve
MHC	Miosina de cadeia pesada
MM	Massa muscular
MME	Massa muscular do extensor longo dos dedos
MMS	Massa muscular do sóleo
MPO	Mieloperoxidase
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NO	Oxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAS	Ácido periódico schiff
PKB	Proteína quinase B
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Retículo sarcoplasmático cálcio ATPase
SOD	Superóxido Dismutase
TFII	Treinamento físico intervalado intenso
Tm	Tropomiosina
Tn	Troponina
TnC	Troponina C
TnI	Troponina I
TnT	Troponina T
VO ₂ máx	Consumo máximo de oxigênio
XO	Xantina oxidase

RESUMO

GUIMARÃES, F.L.R. **Efeitos da inibição do complexo enzimático NADPH oxidase nas adaptações do estado redox e da função contrátil do músculo esquelético induzidas pelo treinamento físico em ratos.** 2015. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015

Acreditava-se inicialmente que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) estava associada apenas aos danos oxidativos e efeitos deletérios às células. Atualmente, evidências sugerem que as EROs desempenham papel benéfico e estão associadas às adaptações estruturais e funcionais das células, por meio de regulação de vias de sinalizações celulares. Nas células musculares, sabe-se que sua função é dependente do estado redox das mesmas. De fato a produção exacerbada destas EROs é um fator limitante da contração muscular, no entanto, um ambiente celular reduzido também afeta negativamente a função muscular. Além disso, adaptações ao exercício físico parecem ser reguladas por vias de sinalizações sensíveis a oxidação por EROs. A NADPH oxidase é um importante complexo enzimático produtor de EROs no músculo esquelético (ME) e considerada como principal fonte de EROs no citosol durante a contração. Além disso, as proteínas envolvidas na contração muscular são sensíveis e reguladas dependente do estado redox celular, e, a NADPH oxidase esta localizada, aparentemente de forma estratégica, próxima a estas proteínas. Desta forma, tornou-se pertinente o estudo da inibição da NADPH oxidase, com apocinina *in vivo*, em adaptações ao treinamento físico intervalado intenso (TFII), uma vez que esta enzima tem sua atividade aumentada em estudos de contração muscular *in vitro*. Para investigar o efeito do TFII associado à administração de apocinina sobre as adaptações estruturais, funcionais e redox do músculo esquelético, foram utilizados ratos wistar (3 meses de idade) distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS), e apocinina treinado (AT). O protocolo de TFII foi de corrida em esteira rolante durante 2 meses (1h, 5x/sem) com intensidade intervalada (3min a 60% VO₂máx e 4min a 85% VO₂máx) em inclinação de 20°. O tratamento com a apocinina (30 mg/kg/dia) foi por gavagem durante 2 meses. Foram avaliadas nos músculos sóleo e EDL, as medidas de capilarização, área de secção transversa (AST), distribuição de tipos de fibra, atividades de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), o estado redox pela razão GSH:GSSG, e lesões oxidativas pelas concentrações de hidroperóxidos lipídicos e proteínas carboniladas. Os resultados demonstraram, que no músculo sóleo, o TFII não alterou a atividade da NADPH oxidase, mas aumentou a capilarização (82%), a atividade da SOD (47%) e a razão GSH:GSSG (52%), e diminuiu a atividade da CAT (-38%). No músculo EDL, o TFII aumentou as atividades das enzimas NADPH oxidase (141%), SOD (36%) e CAT (88%), bem como a capilarização (50%) e mudanças de tipos de fibras. Com isso observou-se que a apocinina não teve efeito sobre a função, estrutura e estado redox do ME de ratos sedentários. No entanto, a apocinina inibiu as adaptações induzidas pelo TFII em ambos os músculos (sóleo e EDL). O TFII aumentou a atividade da NADPH oxidase apenas no músculo EDL mostrando comportamentos diferentes das atividades desta enzima, em resposta a este tipo de treino, entre os músculos de características oxidativas e glicolíticas. Sendo assim, a NADPH oxidase parece participar das vias sinalizadoras para as adaptações induzidas pelo TFII apenas nos músculos glicolíticos. Diante desses resultados, conclui-se que músculos glicolíticos e oxidativos podem ter vias de sinalizações diferentes para as adaptações do ME ao exercício. Isto reforça e também explica a importância da intensidade e duração do exercício em respostas adaptativas, uma vez que estas variáveis influenciam o estado redox e também desencadeiam adaptações diferentes no ME. Futuramente,

informações do estado redox muscular podem ser usadas para melhorar a especialização do treinamento físico de atletas.

Palavras-chave: Treinamento físico, NADPH oxidase, apocinina, estresse oxidativo, músculo esquelético.

ABSTRACT

GUIMARÃES, F.L.R. **Effects of inhibition of the enzymatic complex NADPH oxidase on the adaptations of redox state and contractile function of skeletal muscle induced by physical training in rats.** 2015. 94p. Dissertation (Master of Science) - School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, São Paulo. 2015

Initially it is believed, the production of reactive oxygen species (ROS) was associated just with oxidative damage and harmful effects on cells. Currently, evidence suggests that ROS play beneficial role and are associated with structural and functional adaptations of the cells by means of regulating cellular signaling pathways. In muscle cells, it is known that its function is dependent on the redox state. In fact, the exacerbated production of ROS is a limiting factor of muscle contraction, however, a reduced cellular environment also adversely affects the muscle function. In addition, adaptations to exercise seems to be regulated by signaling pathways sensitive to oxidation by ROS. The NADPH oxidase is an important enzymatic complex producer of ROS in skeletal muscle (SM) and considered as the main source of ROS in the cytosol during contraction. Besides, the proteins involved in muscle contraction are sensitive and controlled by the cellular redox state. Furthermore, NADPH oxidase is located, apparently in a strategic way, next to these proteins. Thus, it has become relevant to the study, in vivo, the inhibition of NADPH oxidase with apocynin on adaptations to high intense interval training (HIIT), since this enzyme activity has been increased in studies of muscle contraction in vitro. To investigate the effect of HIIT associated with the administration of apocynin on the structural and functional adaptations and the redox state of skeletal muscle, Wistar rats (3 months old) were randomly distributed into 4 groups: sedentary control, trained control, sedentary apocynin, and trained apocynin. The HIIT protocol consisted of treadmill running during two months (1h, 5x / week) with intensity intervals (3min 60% VO₂max and 4 min at 85% VO₂max) in a inclination of 20 degrees, and the apocynin treatment (30 mg / kg / day) was by gavage during 2 months. Were evaluated in soleus and EDL muscles, the capillarity, cross-sectional area (CSA), the distribution of fiber types, activities of antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), the redox state by GSH: GSSG ratio, and oxidative damage by concentrations of hydroperoxides lipid and protein carbonyls levels. The results showed that in the soleus muscle, the HIIT did not increase the NADPH oxidase activity, but increased capillarity (82%), the activity of SOD (47%) and the ratio GSH: GSSG (52%), but decreased CAT activity (-38%). In EDL muscle, the HIIT increased the activity of the NADPH oxidase enzyme (141%), SOD (36%) and CAT (88%), and the capillarity (50%) and the change of fiber types. Thus it was observed that apocynin had no effect on the function, structure and redox state of SM of sedentary rats. However, the apocynin inhibited adaptations HIIT induced in both muscles (soleus and EDL). The HIIT increased the activity of NADPH oxidase only in the EDL muscle showing different behaviors of the activity of this enzyme in response to this type of training, between the oxidative and glycolytic muscles. Therefore, NADPH oxidase appears to participate in the signaling pathways for adjustments HIIT induced only in the glycolytic muscles. Given these results, it is concluded that glycolytic and oxidative muscles may have different pathways for the adjustments to the SM to exercise. This reinforces and also explains the importance of the intensity and duration of exercise in adaptive responses, since these variables influence the redox state and also trigger different adjustments in SM. In the future, muscle redox status information could even be used to improve the expertise of physical training of athletes.

Keywords: physical training, NADPH oxidase, apocynin, oxidative stress, and skeletal muscle.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema da atuação das principais vias de produção e remoção de EROs celular (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008).....	26
FIGURA 2 - Esquema do sistema (pro) oxidantes e antioxidantes celular (SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013)	28
FIGURA 3 - Caracterização de um desbalanço redox regulatório e desregulação por estresse oxidativo crônico. (adaptada de DROGE, 2002).....	29
FIGURA 4 - Estrutura muscular esquelética vista das estruturas maiores (músculo, fascículo, fibra, miofibrila) até as menores: unidade funcional (Sarcômero) e as principais proteínas envolvidas na contração muscular (Miosina e Actina). A miosina com seus dois tipos: miosina de cadeia leve (MLC) e miosina de cabeça pesada (MHC); e a actina com as proteínas tropomiosinas e troponina. Adaptada de (JUNQUEIRA, 2008)	30
FIGURA 5 - Resposta da força muscular isométrica em função das concentrações de EROs (POWERS; NELSON; HUDSON, 2011).....	34
FIGURA 6 - Produção de EROs no músculo esquelético interferindo na função de proteínas envolvidas na CM (POWERS; JACKSON, 2008).....	35
FIGURA 7 - Equação da produção de superóxido a partir da redução de NADPH realizado pela NADPH Oxidase	38
FIGURA 8 - Isoformas da NADPH oxidase e em destaque as isoformas que são expressos no músculo esqueléticos (BEDARD; KRAUSE, 2007).....	39

FIGURA 9 - Domínio Heme e Flavina da NADPH oxidase . Adaptado de Lambeth (2004)	40
FIGURA 10 - Esquema de ativação do complexo enzimático NADPH oxidase. Adaptado de Aldieri, et al. (2008).....	41
FIGURA 11 - Formação do dímero de apocinina que impede a ligação das subunidades citosólicas com o citocromo 558 localizado nas membranas celulares (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).....	44
FIGURA 12 - Mecanismo de inibição da Nox 2 pela apocinina (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).	45
FIGURA 13 -. Esquema hipotético da inibição com apocinina do mecanismo de produção de EROs pela da ativação da NADPH oxidase induzida pelo TFII, nas adaptações músculo esqueléticas.....	46
FIGURA 14 - Sequência dos procedimentos experimentais utilizados com os animais <i>in vivo</i>	49
FIGURA 15 - Animal sendo tratado com agulha de gavagem gástrica.	52
FIGURA 16 - Representação do protocolo de fadiga com estimulações a cada 5 segundos no software de análise de função muscular <i>ex vivo</i> no aparelho do banho de órgãos	54
FIGURA 17 - Fotos de cortes histológicos analisados pela atividade da miosina ATPase em pH básico (pH=10.3) dos músculos sóleo em (A) e EDL em (B).....	55
FIGURA 18 - Tolerância ao exercício progressivo, expressa como delta da distância total percorrida (pós menos pré-protocolo), dos grupos controle sedentário, controle treinado, apocinina sedentário e apocinina treinado. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois	

fatores, seguida de post hoc de Turkey, onde: * $p < 0,05$ vs. CS e AS..... 63

FIGURA 19 - Consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) obtido no teste máximo de esforço, realizado nas fases pré e pós-protocolo, dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois fatores com medidas repetidas, seguida de post hoc de Bonferroni. 64

FIGURA 20 - Razão capilar/fibra dos músculos sóleo (A) e EDL (B), dos grupos controle sedentário, controle treinado, apocinina sedentário e apocinina treinado. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Turkey, onde: * $p < 0,05$ vs. CS e AS; + $p < 0,05$ vs. AT. 65

FIGURA 21 - Curva da força específica em função da frequência de estimulação elétrica (força x frequência) dos músculos isolados sóleo (A) e EDL (B), avaliados ex vivo (banho de órgãos), dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). Dados apresentados como média pela ANOVA de dois fatores, com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Turkey, onde: * $p < 0,05$ vs. AT..... 66

FIGURA 22 - Curva do percentual da força máxima (% F_{max}) em função do tempo dos músculos isolados sóleo (A) e EDL (B), avaliados ex vivo (banho de órgãos), dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). Dados apresentados como média pela ANOVA de dois fatores com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Turkey. 67

FIGURA 23 - Área de secção transversa (AST) dos músculos sóleo (A) e EDL (B), dos grupos controle sedentário, controle treinado, apocinina sedentário e apocinina treinado. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Turkey..... 68

- FIGURA 24 - Imagens representativas de cortes histológicos dos músculos sóleo, coradas para miosina ATPase em pH 10.3, e adquiridas em objetiva 20X, dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). As fibras do tipo I são as mais claras, as do tipo IIA marcadas em preto e as intermediárias são acinzentadas. 69
- FIGURA 25 - Imagens representativas de cortes histológicos dos músculos EDL coradas para miosina ATPase, em pH 10.3 e adquiridas em objetiva 20X, dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). As fibras do tipo I são as mais claras (brancas), as do tipo IIA marcadas em preto, IIX cinza mais escuro e IIB cinza mais claro, para cada foto. 70
- FIGURA 26 - Distribuição percentual dos tipos de fibras nos músculos sóleo (A) e EDL (B), dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, analisados pela ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Turkey, , onde: # $p < 0,05$ vs. CS para os tipos de fibra IIA e IIB. 71
- FIGURA 27 - Atividade enzimática da NADPH oxidase nos músculos sóleo, (A) e EDL (B), dos grupos controle sedentário, controle treinado, apocinina sedentário e apocinina treinado. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Turkey, onde: * $p < 0,05$ vs. CS e AT. 72
- FIGURA 28 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no músculo sóleo, (A) e (C) respectivamente, e no músculo EDL (B) e (D), respectivamente, dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Turkey, onde: * $p < 0,05$ vs. CS; # $p < 0,05$ vs. AS. 74
- FIGURA 29 - Razão glutatona reduzida:oxidada (GSH:GSSG) nos músculos sóleo (A) e EDL (B), concentração de hidroperóxidos lipídicos no músculo sóleo (C) e EDL (D) e níveis de proteínas carboniladas no músculo sóleo (E) e EDL

(F), dos grupos controle sedentário, controle treinado, apocinina sedentário e apocinina treinado. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Turkey, onde: * $p < 0,05$ vs. CS; # $p < 0,05$ vs. CT. 76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Massa corporal e massa dos músculos sóleo e plantar dos ratos.....	59
---	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Características dos principais tipos de fibra muscular quanto as características metabólicas e função muscular (FLECK, 1997).	32
QUADRO 2 - constituição dos grupos experimentais.....	48
QUADRO 3 - Resumos dos principais resultados	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	24
2.2 DEFESA ANTIOXIDANTE	26
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO	27
2.4 ESTRUTURAÇÃO E FUNÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO	29
2.5 FADIGA MUSCULAR E ESTRESSE OXIDATIVO	32
2.6 INFLUÊNCIA DE EROS NA FUNÇÃO CONTRÁTIL DO MÚSCULO ESQUELÉTICO	33
2.7 ADAPTAÇÕES MORFOFUNCIONAIS E REDOX DO MÚSCULO ESQUELÉTICO AO EXERCÍCIO FÍSICO.....	36
2.8 TREINAMENTO FÍSICO INTERVALADO INTENSO (TFII)	37
2.9 NADPH OXIDASE: ISOFORMAS, ATIVAÇÃO E INIBIÇÃO	38
2.10 APOCININA	42
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 GERAL	47
3.2 ESPECÍFICOS	47
4. MÉTODOS	48
4.1 AMOSTRA E MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS	48
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL	48
4.3 SEQUÊNCIA DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	49
4.4 PROTOCOLO DO TESTE PARA DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA AERÓBICA (VO ₂ MÁX).....	49
4.5 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO INTERVALADO INTENSO (TFII)	51
4.6 PROTOCOLO DE TRATAMENTO ORAL COM APOCININA.....	51
4.7 SACRIFÍCIO E COLETA DOS TECIDOS.....	52
4.8 A AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CONTRÁTIL EX VIVO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO	52
4.8.1 Preparação do Músculo e Fixação no Banho de Órgãos	52
4.8.2 Sistema de Estimulação Elétrica e Registro da Força Muscular Isométrica.....	53
4.8.3 Protocolos de Avaliação Curva Força x Frequência	54
4.8.4 Protocolo de indução à fadiga.....	54
4.9 ANÁLISES DA ESTRUTURA DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA	55
4.9.1 Determinação da área de secção transversa (AST) e distribuição de tipos de fibras no músculo esquelético	55
4.9.2 Razão capilar por fibra do músculo esquelético.....	56
4.10 AVALIAÇÃO DO BALANÇO REDOX NO MÚSCULO ESQUELÉTICO	57
4.10.1 Atividade do Complexo Enzimático NAD(P)H Oxidase	57
4.10.2 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)	57
4.10.3 Atividade da Enzima Catalase	58
4.10.4 Índice de Peroxidação Lipídica	58
4.10.5 Carbonilação de Proteínas	59
4.10.6 Estado Redox da Glutathione	59
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5. RESULTADOS.....	61
5.1 MASSA CORPORAL	61
5.2 MASSA MUSCULAR ESQUELÉTICA.....	62
5.3 TOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO PROGRESSIVO	62
5.4 POTÊNCIA AERÓBICA.....	63
5.5 CAPILARIZAÇÃO MUSCULAR	64
5.6 FUNÇÃO CONTRÁTIL EX VIVO.....	65
5.6.1 Curva força x frequência	65
5.6.2 Curva de Fadiga muscular	66
5.7 ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA MUSCULAR ESQUELÉTICA	67
5.8 DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES	68

5.9 ATIVIDADE DA NADPH OXIDASE	71
5.10 DEFESA ANTIOXIDANTE MUSCULAR	72
5.10.1 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase	73
5.10.2 Atividade da Enzima Catalase	73
5.11 ESTADO REDOX E ESTRESSE OXIDATIVO MUSCULAR.....	74
5.11.1 Razão GSH:GSSG.....	75
5.10.2 Hidroperóxidos Lipídicos	75
5.10.3 Proteínas Carboniladas	75
6. DISCUSSÃO.....	78
6.1 MASSA CORPORAL	78
6.2 MASSA MUSCULAR	79
6.3 TOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO.....	80
6.4 POTÊNCIA AERÓBICA.....	80
6.5 CAPILARIZAÇÃO	81
6.6 FUNÇÃO MUSCULAR	81
6.7 ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA MUSCULAR ESQUELÉTICA	82
6.8 DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS DE FIBRAS.....	82
6.9 ATIVIDADE DA NADPH OXIDASE	83
6.10 DEFESA ANTIOXIDANTE	85
6.11 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	87
7. CONCLUSÃO	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1. INTRODUÇÃO

Mesmo em repouso, as células musculares produzem continuamente espécies reativas de oxigênio (EROs). O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é a principal espécie reativa de oxigênio gerada pelo músculo esquelético (ME), sendo produzido em diferentes compartimentos e por diferentes vias, enzimáticas e não enzimáticas, dentro da fibra muscular, tais como a mitocôndria, a enzima xantina oxidase (XO) e o complexo enzimático NADPH oxidase, entre outras (POWERS; JACKSON, 2008).

Para que não ocorra um acúmulo de $O_2^{\cdot-}$, as células contam com um complexo sistema de defesa antioxidante composto por enzimas (ex. superóxido dismutase e catalase) e não enzimas (ex. glutatona e vitamina C) que participam da remoção e eliminação das EROs, possibilitando a manutenção do balanço oxidante-redutor (estado redox), importante para a sua sobrevivência e adaptação aos diferentes tipos de estresse (JI, 2008).

O estresse oxidativo celular, caracterizado por um desbalanço redox, decorrente da ativação de vias produtoras de EROs e/ou da limitação das vias de defesa antioxidante, resulta na oxidação e alteração irreversível de diversas biomoléculas (POWERS; JACKSON, 2008). Além disso, o estresse oxidativo tem sido associado à atrofia e/ou diminuição da capacidade contrátil do ME observada em diversas patologias como arteriosclerose, diabetes, insuficiência cardíaca, entre outras (RABELO et al., 2010). Assim, devido ao fato da disfunção muscular estar associada à intolerância ao esforço e a um mau prognóstico nestas patologias (BRUM et al., 2011), existe um grande interesse em se compreender qual o papel das EROs na regulação da contração muscular (CM).

A função celular normal é controlada por um complexo sistema de comunicação que governa as suas atividades, denominadas vias de sinalização (JI, 2008). Classicamente, o aumento da produção de EROs esteve associado ao estresse oxidativo e a disfunção celular decorrente das alterações oxidativas provocadas em diversas biomoléculas (JI, 2008). Entretanto, mais recentemente tem sido destacado que a produção de EROs pode ter papel importante na sinalização celular normal (DROGE, 2002), denominada de sinalização modulada por reações redox, que envolve a alteração reversível do estado de fosforilação celular via atividades de quinases e fosfatases, entre outras. Assim, a produção de EROs parece estar envolvida nas adaptações celulares benéficas à diferentes tipos de estresse, dentre eles o exercício físico, garantindo proteção às células. No entanto, o papel que a produção de

superóxido pelo ME tem na regulação da atividade contrátil ainda não está completamente esclarecido.

Avanços metodológicos e tecnológicos têm possibilitado demonstrar com maior clareza que ocorre um aumento da produção de EROs pelo ME durante o exercício, e que este aumento é intensidade dependente (POWERS; JACKSON, 2008). Se por um lado os estudos iniciais associavam o aumento da produção de EROs induzida pelo exercício como sendo potencialmente maléfica, por estar associada à lesões oxidativas, em proteínas e lipídios, e ao prejuízo ao desempenho muscular, para outros, o treinamento físico foi capaz de promover importantes adaptações benéficas na função muscular (POWERS; JACKSON, 2008). Os mecanismos envolvidos nas adaptações musculares ao treinamento físico são complexos e dentre eles está o aumento da produção de EROs de forma controlada (intensidade) e limitada (duração) que ocorre a cada sessão de exercício, desencadeando diversas adaptações crônicas como o aumento da atividade e expressão de enzimas antioxidantes (JI, 2008), o controle de fatores de transcrição redox sensíveis e aumento da captação de glicose e biogênese mitocondrial (POWERS; JACKSON, 2008), associados a uma maior proteção contra danos oxidativos futuros (RAMIRES; JI, 2001). Por outro lado, uma produção de EROs exagerada e descontrolada (duradoura) é prejudicial e está associada a danos celulares irreversíveis observados em patologias e mesmo em exercícios exaustivos e muito prolongados (POWERS; JACKSON, 2008; RABELO et al., 2010).

Assim, como a produção de EROs pode prejudicar a função celular e o exercício físico aumenta a produção de EROs (POWERS; JACKSON, 2008), muito esforço tem sido feito para compreender os mecanismos redox envolvidos na adaptação da função contrátil do ME ao treinamento físico.

O efeito da produção de EROs induzida pelo exercício sobre a atividade contrátil do músculo parece ser concentração dependente. Interessantemente, a diminuição da concentração de EROs atenua a força de contração enquanto um ligeiro aumento de superóxido acarreta em maior força produzida. No entanto, um excessivo aumento de EROs promove prejuízo na contração, caracterizando uma resposta em forma de sino. Além disso, recentemente foi demonstrado, em músculo isolado de sapo, que a produção de EROs está envolvida na fadiga muscular durante o processo de contração de moderada intensidade *in vitro* (ZUO; NOGUEIRA; HOGAN, 2011).

O complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH oxidase) tem sido caracterizado como uma importante fonte de $O_2^{\cdot -}$ no ME durante a contração (MICHAELSON et al., 2010). Além disso, em patologias cardiovasculares, o

estresse oxidativo decorrente de uma maior atividade da NADPH oxidase tem sido associado aos processos inflamatórios, perda de massa muscular e disfunção contrátil (RABELO et al., 2010). Deste modo, uma abordagem experimental que se apresenta naturalmente é o uso de inibidores da atividade da NADPH oxidase a fim de se atenuar o estresse oxidativo e reverter seus malefícios no ME. No entanto, esta estratégia precisa ser investigada levando-se em consideração que, durante o exercício físico, a produção controlada de EROs parece estar envolvida nas adaptações benéficas estruturais e funcionais do ME.

Portanto, o presente estudo investigou se a inibição da NADPH oxidase com apocinina influencia nas adaptações do estado redox, da estrutura e da função contrátil *ex vivo* do músculo esquelético induzidas pelo treinamento físico aeróbico intervalado intenso em ratos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espécies Reativas de Oxigênio

Espécies reativas são átomos ou moléculas que reagem rapidamente com outras moléculas e por isso seu tempo de vida é bastante curto (FERREIRA, L. F.; REID, 2008). As espécies reativas de oxigênio (EROs) e as de nitrogênio (ERNs) são de maior relevância na biologia. Mas em se tratando de fadiga muscular, as EROs têm merecido grande destaque (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008; FERREIRA, L. F.; REID, 2008).

O oxigênio molecular está presente em grande quantidade na atmosfera e é capaz de reagir com diversos átomos e moléculas. Por ser um birradical, o oxigênio é considerado um excelente receptor de elétrons. Por esse motivo, ele é vital para a vida humana e de todos os organismos aeróbios, pois no metabolismo energético celular, o oxigênio tem o importante papel de aceptor final de elétrons ao final da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Resumidamente, a transferência de energia para o trabalho celular inicia-se com a extração enzimática de elétrons (oxidação) dos substratos energéticos (carboidratos, lipídios e proteínas) e a redução do NAD^+ e FAD^+ para $\text{NADH}+\text{H}^+$ e FADH_2 . Em seguida, estes $\text{NADH}+\text{H}^+$ e FADH_2 transferem os elétrons para a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, onde, no final, o oxigênio molecular é reduzido à água. Se por um lado a participação do oxigênio nestes processos de oxido-redução é essencial para a vida aeróbia, por outro, ele pode resultar na produção de EROs, as quais precisam ser estritamente controladas para evitar estresse oxidativo (SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013).

Existem várias EROs dentre elas as mais importantes que podemos citar: superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), oxigênio singlete, óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO^-), hipoclorito (HOCl) (POWERS; JACKSON, 2008; SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013).

O superóxido, a principal espécie reativa produzida pela NADPH oxidase, é relativamente impermeável às membranas e tem um tempo de meia vida longo quando comparado a outras EROs. Isso permite sua difusão no meio intracelular facilitando a interação com outras moléculas da célula (POWERS; JACKSON, 2008).

No entanto, o O_2^- pode reagir entre si e formar outras espécies como o H_2O_2 que é tóxico, apesar de considerado um oxidante fraco, e permeável a membranas celulares. Esta

última característica permite ao peróxido de hidrogênio ultrapassar membranas facilmente, o que o torna uma importante molécula para a sinalização celular (SCHRODER et al., 2012) (SCHRODER et al., 2012). O peróxido de hidrogênio não reage diretamente com DNA e lipídios, mas pode inativar enzimas bem como reagir com metais formando o $\text{OH}^\cdot$ que é altamente tóxico para célula podendo inclusive reagir com o DNA (AUGUST, 2006; POWERS; JACKSON, 2008). Além da formação de peróxido de hidrogênio, o $\text{O}_2^\cdot$ também pode reagir com o NO disponível na célula e formar o peróxinitrito, o qual é altamente tóxico para a célula, numa velocidade maior do que a dismutação do $\text{O}_2^\cdot$ em H_2O_2 (POWERS; JACKSON, 2008).

Então numa forma direta ou indireta as EROs podem ser danosas as células, especialmente quando há produção exarcebada destas, oxidando proteínas e consequentemente inativando e/ou alterando suas funções, assim como também destruindo membranas celulares através da oxidação dos lipídios que as estruturam e ainda reagir com moléculas de DNA (AUGUST, 2006; POWERS; JACKSON, 2008). No entanto, atualmente muito têm sido investigado sobre o papel benéfico das EROs na sinalização redox de vias envolvidas nas adaptações do ME ao exercício físico (JI, 2008).

Deste modo, não só por seus efeitos maléficos, mas também por aqueles que podem determinar adaptações celulares na busca de homeostase e funcionamento normal, o estudo das fontes de EROs foi e tem sido de fundamental importância para assuntos relacionados ao estresse oxidativo (POWERS; JACKSON, 2008; POWERS; NELSON; HUDSON, 2011). As EROs geralmente formadas pela redução incompleta de O_2 podem ser produzidas principalmente na mitocôndria, e como produto de ações enzimáticas vindas das NADPH oxidases, xantina oxidase e família das fosfolipases A_2 (FIGURAS 1 e 2) (SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013).

A NADPH oxidase utiliza como substrato a NADPH transportando elétrons que desencadeiam a produção de superóxido ($\text{O}_2^\cdot$). Já a xantina oxidase (XO) produz o $\text{O}_2^\cdot$ com a xantina a partir da reação hipoxantina com água e oxigênio. Além delas, outras contribuidoras de EROs no ambiente da célula muscular esquelética, as fosfolipases A_2 , não geram EROs diretamente, mas fazem hidrólises de fosfolipídios liberando ácido aracdônico, substrato das lipooxygenases, que também fazem partes das enzimas produtoras de $\text{O}_2^\cdot$ (POWERS; JACKSON, 2008; POHANKA, 2013).

2.2 Defesa Antioxidante

Por todos os efeitos já descritos pelo excesso de oxidantes no meio celular, seria realmente esperado que a fibra muscular tivesse um sistema de defesa antioxidante a fim de se defender do estresse oxidativo exacerbado, inclusive o induzido pelo exercício. De fato, a organização celular para esta defesa depende de complexo sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013).

A enzima superóxido desmutase (SOD) é importante defesa contra o acúmulo de superóxido. A SOD possui um metal no seu sítio catalítico capaz de reduzir o $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . As isoformas (SOD1, SOD2, SOD3) são diferenciadas pelo metal (Mn, Zn ou combinação deles) que possuem no seu sítio catalítico e sua localização dentro da célula. Além disso, a defesa antioxidante celular também conta com a ação da enzima catalase (CAT) que elimina o H_2O_2 e produz água e oxigênio molecular (FIGURA 1 e 2). Porém, sob baixas concentrações de H_2O_2 , é a enzima glutathiona peroxidase (GPX) que tem maior afinidade com esta espécie reduzindo-a a H_2O mais álcool (FIGURA 1 e 2). Somando-se a CAT e GPX na redução de H_2O_2 , as enzimas peroxiredoxinas (PRXs) utilizam-se das suas cisteínas para suas ações antioxidantes, são expressas em seis isoformas (PRX I, II, III, IV, V, VI) e também estão compartimentalizadas na célula (POWERS; JACKSON, 2008; SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013).

FIGURA 1 - Esquema da atuação das principais vias de produção e remoção de EROs celular (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008)

Além das enzimas antioxidantes, a fibra muscular se vale de defesas não enzimáticas contra o estresse oxidativo. Para o ME e demais tecidos que também sofrem grande exposição de oxidantes, a Glutathione (GSH) aparece como um antioxidante bastante importante. Interessantemente, o conteúdo de GSH dentro da fibra muscular é tipo específica, sendo maior em fibras de contração lenta (oxidativa). Além disso, os níveis de GSH aumentam em respostas ao treinamento físico de alta intensidade. Esta adaptação parece ser resultado de exposição da célula à oxidantes durante o exercício e possibilita a neutralização do estresse oxidativo. A GSH pode reagir diretamente com oxidantes reduzindo-os, como também servir de substrato para a enzima GPX na redução do H_2O_2 (FIGURA 1). Além disso, a GSH também é capaz de reduzir outros antioxidantes previamente oxidados, como no caso das vitaminas "E" e "C", mantendo-os em estado reduzidos. Estas vitaminas também agem como antioxidantes e podem ser adquiridos através da dieta (POWERS; JACKSON, 2008).

2.3 Estresse Oxidativo

O termo estresse oxidativo foi definido anteriormente como o desequilíbrio entre a produção de oxidantes e ação de antioxidantes, resultado no acúmulo de oxidantes e subsequente danos oxidativos celulares (POWERS; JACKSON, 2008). Mais recentemente, a partir de constatações de que algumas EROs também estão envolvidas na regulação de vias celulares (sinalizações redox), JONES (2006) definiu o estresse oxidativo como sendo “o rompimento da sinalização redox e controle celular”. Esta nova definição está baseada em estudos que constataram um desequilíbrio redox em compartimentos celulares e vias de sinalização específicas, que podem levar a alterações metabólicas em locais específicos nas células, sem necessariamente estar ocorrendo um estresse oxidativo global de pró-oxidantes e antioxidantes.

Portanto, cabe destacar que a análise dos efeitos da produção de EROs é uma temática bastante complexa, visto que elas podem ser maléficas por desencadear o estresse oxidativo generalizado ou promover a desregulação de vias de sinalização específicas. Por outro lado, as EROs parecem ser importantes para a regulação de vias benéficas para a função e adaptação celular ao estresse, como o próprio exercício físico (JI, 2008; POWERS; JACKSON, 2008).

FIGURA 2 - Esquema do sistema (pro) oxidantes e antioxidantes celular (SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013)

De fato, vias de transdução de sinal sensíveis ao estresse oxidativo estão associadas a expressão gênica de enzimas e proteínas importantes para o equilíbrio redox (JI, 2008). Isto explica porque o exercício físico, mesmo estimulando a produção de EROs, tem fundamental importância na promoção da saúde uma vez que as EROs produzidas também participam de adaptações músculo esqueléticas ao exercício que servem de proteção deste tecido a danos musculares (JI, 2008; POWERS; NELSON; HUDSON, 2011). Além disso, o exercício normalmente é um estímulo redox único, ou seja, por um determinado período do dia, diferente do estresse oxidativo desencadeado em patologias as quais têm estímulos constantes (FIGURA 3) (DROGE, 2002).

Sendo então o equilíbrio redox de fundamental importância para saúde dos sistemas, e conseqüentemente do organismo como um todo, muitos estudos buscam entender

o papel das EROs não só como um agente danoso ao sistema mais também como agente importante para um bom funcionamento e proteção celular (POWERS; JACKSON, 2008).

FIGURA 3 - Caracterização de um desbalanço redox regulatório e desregulação por estresse oxidativo crônico. (adaptada de DROGE, 2002)

2.4 Estruturação e Função do Músculo Esquelético

A eficiência na função muscular esquelética depende da estrutura, da mecânica e da bioquímica das fibras musculares. O sarcômero (FIGURA 4), unidade funcional da fibra muscular, é composto por diversas proteínas, destacando-se as que formam os miofilamentos contráteis como a miosina (filamentos grossos) e a actina (filamentos finos) (FIGURA 4), as quais sofrem mudanças nas suas conformações dependentes da disponibilidade de cálcio e ATP, a fim de gerar e regular tensão para a contração muscular (LIEBER, 2009).

A actina contém as proteínas tropomiosina (Tm) e troponina (Tn) com suas 3 subunidades: TnT que liga a Tn a Tm, TnC que é um sítio para ligação do cálcio e TnI que realiza ação inibitória na falta do íon cálcio (FIGURA 4). Já a miosina subdivide-se em miosina de cadeia leve (MLC) e miosina de cadeia pesada (MHC) (FIGURA 4). A primeira refere-se à cauda e a segunda à cabeça da miosina. MHC contém uma região (S1) que vai se

conectar a actina e outra (S2) responsável pela projeção de S1 para a actina para realização da CM (GORDON; HOMSHER; REGNIER, 2000; LIEBER, 2009)

FIGURA 4 - Estrutura muscular esquelética vista das estruturas maiores (músculo, fascículo, fibra, miofibrila) até as menores: unidade funcional (Sarcômero) e as principais proteínas envolvidas na contração muscular (Miosina e Actina). A miosina com seus dois tipos: miosina de cadeia leve (MLC) e miosina de cabeça pesada (MHC); e a actina com as proteínas tropomiosinas e troponina. Adaptada de (JUNQUEIRA, 2008)

A CM é dependente de cálcio e, é estimulada a partir do potencial de ação da membrana para os túbulos T, que por sua vez, é capaz de ativar receptores de dihidropiridina (DHPR). Uma vez estimulados, os receptores de DHPR ativam os receptores de rianodina (RyR) desencadeando a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) para o citosol (LAMB; WESTERBLAD, 2011).

O Ca^{2+} liberado no citosol, liga-se a TnC, provoca uma mudança na conformação do filamento de actina e expõe os sítios de ligações da actina a cabeça de miosina, aumentando a afinidade entre estes filamentos para a formação das pontes cruzadas por ações alostéricas (GORDON; HOMSHER; REGNIER, 2000; MCARDLE, 2008; WESTERBLAD; ALLEN, 2011). Esta interação ativa uma enzima chamada miosina ATPase que, em presença de ATP, o degrada produzindo ADP, Pi e energia necessária para ocorrer a CM. A energia liberada provoca o movimento da cabeça da miosina a fim de interagir com o filamento de actina e provocar o deslocamento em paralelo e em direções opostas entre filamentos e encurtamento do sarcômero (MCARDLE, 2008).

Enquanto a concentração de Ca^{2+} é suficiente, a acoplagem dos filamentos de miosina e actina são possíveis. Sem cálcio, a conformação das proteínas Tm e Tn retorna a posição inicial agindo de formas inibidoras das pontes cruzadas e da miosina ATPase (GORDON; HOMSHER; REGNIER, 2000; MCARDLE, 2008; WESTERBLAD; ALLEN, 2011).

Cessando o potencial de ação, o Ca^{2+} retorna ao RS por um bombeamento ativo dependente de ATP e realizado pela enzima retículo sarcoplasmático cálcio ATPase (SERCA). Alterações nesse ciclo são capazes de influenciar a contratilidade do ME (WESTERBLAD; ALLEN, 2011).

Para (GORDON; HOMSHER; REGNIER, 2000), a afinidade entre essas proteínas contráteis de actina e miosina dependem também da distância entre as cabeças de miosina e os sítios de ligação na actina. Este fato seria influenciado pelo alongamento do sarcômero, o que marca a importância do comprimento ótimo na eficiência da CM, pois o cálcio modula a velocidade do deslizamento dos filamentos finos com limitações dependentes do número de pontes cruzadas interagidas sobre eles.

O músculo esquelético é constituído por tipos de fibras musculares de características estruturais e bioquímicas diferentes. Estas são classificadas quanto as suas velocidades de contração muscular podendo ser de contração lenta (tipo I) e contração rápida (tipo II). A do tipo II se subdivide ainda em tipos IIa, IIx e IIb em ratos. A velocidade de contração tem uma relação com a atividade da miosina ATPase que varia de acordo com a

expressão de isoformas da miosina (MHC1 β , MHCIIa, MHCIIx e MHCIIb). Além disso os tipos de fibras diferem no seu metabolismo e estruturalmente. As fibras tipo I são mais oxidativas e capilarizadas, possuem um maior número de mitocôndrias e uma melhor defesa antioxidante e portanto são menos fatigáveis que as fibras tipo II. As fibras tipo II por sua vez, são de características glicolíticas, mais sujeitas ao estresse oxidativo e portanto mais fatigáveis (QUADRO 1) (FLECK, 1997; POWERS; JACKSON, 2008).

QUADRO 1 - Características dos principais tipos de fibra muscular quanto as características metabólicas e função muscular (FLECK, 1997).

Características	Fibras		
	Tipo I	Fibras Tipo IIA	Fibras Tipo IIB
Força por Área de Secção Transversa	baixa	elevada	elevada
Estoque de Triglicerídeo Intramuscular	elevado	baixo	baixo
Tempo de Relaxamento	lento	rápido	rápido
Velocidade Contrátil	baixa	elevada	elevada
Resistência a Fadiga	alta	média	baixa
Densidade Capilar	alta	média	baixa
Conteúdo de Mioglobina	alto	médio	baixo
Conteúdo de Glicogênio	sem diferença	sem diferença	sem diferença
Atividade Enzimática Glicogenolítica	baixa	alta	alta
Atividade Enzimática Mitocondrial	alta	média	baixa
Atividade da ATPase Miofibrilar	baixa	Alta	Alta

2.5 Fadiga Muscular e Estresse Oxidativo

Para Allen, Lamb e Westerblad (2008), fadiga muscular (FM) é uma perda progressiva e temporária de potência e tensão muscular, e a sua continuidade leva ao que eles chamam de exaustão. Powers, Nelson e Hudson (2011) propõem a definição de que a FM seria a redução da produção de força muscular máxima induzida pelo exercício quando os músculos fossem usados intensivamente.

Para Kuwahara, et al. (2010), uma maior produção de EROs por exercícios intensos tem sido proposta como uma das maiores causas de FM, pois eles provocariam um maior desequilíbrio entre a produção de EROs e respostas antioxidantes chamado por Stefanska e Pawliczak (2008) de estresse oxidativo e capaz de interferir no funcionamento normal de proteínas envolvidas na CM.

No entanto, uma simples sessão de exercício é capaz de aumentar atividades de enzimas antioxidantes (JACKSON, 2011), bem como é moduladora de defesa antioxidante como uma adaptação do mesmo exercício, proporcionando maior resistência a fadiga (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008; JI, 2008; SACHDEV; DAVIES, 2008).

Estudos anteriores relacionaram a fadiga muscular com: acidose devido ao acúmulo de ácido láctico, falha do sistema no processo excitação-contração e depleção de glicogênio. Esses estudos ajudaram a perceber que as fibras de contração rápida fatigavam mais rápido que as fibras de contração lenta (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008), pois em experimentos realizados em músculos isolados, elas respondem ao estímulo nervoso numa proporção maior do que nas fibras de contrações lentas por uma maior velocidade de liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e disposição do mesmo às proteínas contráteis (MCARDLE, 2008). Além disso, as fibras de contração lenta também possuem uma maior atividade das enzimas antioxidantes o que permite maior equilíbrio redox durante o exercício e consequentemente atraso da fadiga muscular (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008; JI, 2008).

Como pró-oxidante, a NADPH oxidase pode estar envolvida na fadiga muscular, uma vez que estimulações tetânicas em culturas de fibras musculares esqueléticas foram capazes de aumentar a produção de EROs dependente desta enzima. As mesmas EROs estariam envolvidas na oxidação de proteínas envolvidas na contração muscular (HIDALGO et al., 2006; ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008; SAKELLARIOU et al., 2013). De fato, a despolarização de membrana de células fagocitárias ativa a NADPH oxidase (HIDALGO et al., 2006), bem como no ME, estimulações elétricas em fibras isoladas aumentam a produção de EROs por esta enzima (SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013; SAKELLARIOU et al., 2013).

2.6 Influência de EROs na Função Contrátil do Músculo Esquelético

Nos dias atuais, sabe-se que essa liberação de Ca^{2+} pelo RS falha em vários tipos de fadiga, e há discussões sobre o que poderia influenciar esse fato como: variações na voltagem de ativação pelo sistema sensorio motor, mudanças em metabólitos mioplasmáticos ou até a depleção de Ca^{2+} dentro do RS (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008).

Resumidamente, o $O_2^{\cdot-}$ que é produzido também pela NADPH oxidase, foco de nosso estudo, é uma das EROs produzidas no ME, e de proporção maior durante o exercício físico. Apesar de não ser muito tóxico, ele pode extrair elétrons das membranas e de outros componentes celulares e provocar uma cadeia de reações como a formação do radical hidroxil ($OH^{\cdot}$). Este por sua vez, é extremamente reativo e com potencial de oxidação alto. O $O_2^{\cdot-}$ ainda pode reagir com óxido nítrico (NO) diminuindo a biodisponibilidade de $O_2^{\cdot-}$ e NO e formando o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), que é um agente forte e responsável na depleção de grupos tióis, danos de DNA e nitração de proteínas (POWERS; JACKSON, 2008).

FIGURA 5 - Resposta da força muscular isométrica em função das concentrações de EROs (POWERS; NELSON; HUDSON, 2011)

As proteínas envolvidas na CM são altamente sensíveis a essas EROs. Suas modificações são influenciadas pelas concentrações dessas espécies e do período de exposição a elas (FIGURA 5), fato este de fundamental importância na produção de força pelo ME (POWERS; JACKSON, 2008; POWERS; NELSON; HUDSON, 2011). Altas concentrações de catalase (CAT), “varredor” de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foram capazes de abolir respostas contráteis no ME. Porém adições variadas de concentrações de H_2O_2 as potencializam, até que uma concentração fosse tamanha para inibir a contratilidade do mesmo (POWERS; JACKSON, 2008). Fatos como este levaram (POWERS; JACKSON, 2008) a

considerar a necessidade de certo nível de oxidação no citosol para um funcionamento ótimo da célula muscular esquelética (FIGURA 5).

Embora ainda controverso na literatura, a mitocôndria têm sido considerada importante fonte de EROs em fibras musculares, associado ao aumento do consumo de oxigênio. Porém, comparações entre os diferentes tipos de fibras mostram que nas de tipo II (glicolíticas) a razão entre a produção de peróxido de oxigênio por oxigênio consumido é maior do que na fibra do tipo I (oxidativa), sugerindo que a mitocôndria não seria a fonte primária de EROs no músculo esquelético durante o exercício. (POWERS; JACKSON, 2008). Além disso, recentemente, Michaelson, et al (2010) acompanharam a produção de O_2^- durante 15 minutos de repetidas contrações musculares tetânicas e concluíram que a mitocôndria não contribuía significativamente com essa produção.

FIGURA 6 - Produção de EROs no músculo esquelético interferindo na função de proteínas envolvidas na CM (POWERS; JACKSON, 2008)

Lamb e Westerblad (2011) mostram que a produção de EROs mitocondrial não está aumentada durante a FM induzida por estímulos tetânicos, mas que mensurações de

EROs no citosol aumentaram durante os mesmos estímulos fatigantes. Fato que pode estar associado à ativação da enzima NADPH oxidase, encontradas principalmente nas membranas plasmáticas, retículo sarcoplasmático e nos túbulos transversos (túbulos T), de uma maneira que parece estratégia de controle funcional da fibra muscular esquelética, uma vez que as proteínas envolvidas na contração são redox sensíveis (FIGURA 2) (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008; LAMB; WESTERBLAD, 2011; POWERS; NELSON; HUDSON, 2011).

Quando as proteínas dos miofilamentos são oxidadas, elas parecem mudar suas estruturas e funções, alterando sua sensibilidade ao cálcio (MOOPANAR; ALLEN, 2005; LAMB; WESTERBLAD, 2011). Os grupos sulfidrilas do RyR também são sensíveis a modulações redox e a SERCA pode ser inibida por oxidação dos grupos tióis ou, quando em ambientes de estado redox reduzido, ter seus grupos sulfidrilas reduzidos dificultando a hidrólise de ATP (FIGURA 6) (POWERS; NELSON; HUDSON, 2011).

2.7 Adaptações Morfofuncionais e Redox do Músculo Esquelético ao Exercício Físico

Pensando no plano da fisiologia, a proposta do exercício físico tem como base promover adaptações que possibilitem a melhora das capacidades fisiológicas a fim de preparar o organismo para receber novos estímulos de exercício (LAURSEN, 2010). Com isso, a célula, e em especial a fibra muscular, sofre alterações como mecanismo de proteção contra futuros danos celulares. Estas adaptações envolvem mudanças transcricionais de proteínas, com o fim de manter a homeostase e boa funcionalidade contrátil e, consequentemente aumentar a força máxima e a resistência à fadiga. De fato, a melhoria da função muscular decorrente do treinamento físico depende das adaptações nos aparatos contráteis da fibra muscular, os quais dependem do tipo de exercício aplicado, considerando volume, a intensidade e a frequência do mesmo (POWERS et al., 1994; GIBALA et al., 2006; SEENE; KAASIK; UMNOVA, 2009).

Dentro das adaptações morfológicas ao treinamento físico de resistência aeróbia engloba: o aumento da área de secção transversa do músculo inteiro e fibras individuais, assim como o tamanho e número das miofibrilas (SEENE; KAASIK; UMNOVA, 2009). O metabolismo celular também muda. Há uma maior disponibilidade de glicogênio no músculo, porém, seu catabolismo é reduzido pelo aumento da densidade mitocondrial e das atividades

enzimáticas do ciclo tricarboxílico e da cadeia de transportes de elétrons. Maiores intensidades nesses tipos de treino também foram capazes de melhorar a capacidade oxidativa (GIBALA et al., 2006).

A descoberta do aumento da produção de EROs no ME pelo exercício incentivou pesquisadores em verificar como as células se defendiam do estresse oxidativo e qual seria o comportamento das vias antioxidantes com o exercício. Muitas respostas foram contraditórias. Isso poderia estar relacionado a tipos diferentes de protocolos de treino e músculos com características de fibras diferentes. Porém, um consenso se instaurou sobre os estudos que obtiveram aumento da atividade das enzimas antioxidantes induzido pelo exercício. Geralmente os protocolos de treino continham altas intensidades e longas durações. Sendo as fibras oxidativas as mais responsivas em aumentar a defesa antioxidante induzida pelo treinamento (POWERS et al., 1994). Hoje, sabe-se que a resposta adaptativa inicial ao aumento de EROs no ME induzido pela CM é o aumento de enzimas antioxidantes e proteínas sinalizadoras de aumento de estresse na célula (POWERS; JACKSON, 2008).

De modo importante, as EROs ativam complexos protéicos envolvidos no controle de transcrição de DNA e outras proteínas que regulam várias atividades celulares como no caso da expressão gênica. Assim, genes de proteínas antioxidantes são regulados como resposta ao estresse oxidativo provocado pelo exercício físico a fim de manter o equilíbrio redox da célula (JI, 2008). Interessantemente, estudos com suplementação com antioxidantes diminuíram as respostas adaptativas ao exercício (POWERS; JACKSON, 2008).

2.8 Treinamento Físico Intervalado Intenso (TFII)

O TFII é caracterizado por variações de períodos de trabalho intermitente (80 a 95%) com intervalos de descansos passivos ou ativos em menor intensidade (40 a 50% da frequência cardíaca máxima) (WHITEHURST, 2012). Por ser uma alternativa de tipo de treino que demanda menos tempo e promove adaptações de características parecidas, e por vezes maiores do que as de treinos aeróbicos contínuos, o TFII vem ganhando um espaço preferencial nas prescrições de exercícios (WHITEHURST, 2012).

Quando em casos de intervenção nas doenças e benefícios à saúde, o exercício é mais prescrito com intensidades moderadas a fim de eliminar riscos de acidentes

cardiovasculares. No entanto, uma relação foi encontrada entre a intensidade de exercício e a melhora da função cardíaca (WISLOFF; ELLINGSEN; KEMI, 2009). Comparativos entre tipos de exercício foram realizados e, o TFII foi capaz de potencializar a melhora de capacidade cardiorrespiratória em humanos mesmo com a metade do tempo de treino semanal de corrida prolongada (NYBO, 2010).

Há, portanto uma melhora da capacidade das células musculares de oxidar substratos, através de ativação de fatores de transcrições que comandam expressões de genes nucleares e mitocondriais. Isto faz do TFII um tipo de treino com características de grande ativação das vias oxidativas, especialmente nos protocolos de exercícios em que os tempos de estimulações intensas são perto de 4min (WHITEHURST, 2012). No entanto, mesmo frente a estas adaptações metabólicas aeróbicas já citadas, o TFII também promove aumento da vascularização (SEENE; KAASIK; UMNOVA, 2009; CUNHA et al., 2012), e promove hipertrofia muscular esquelética (CUNHA et al., 2012).

Outra grande característica do músculo esquelético, a plasticidade, varia também de acordo com o tipo de exercício. Em resposta ao TFII já sabemos que em plantares de ratas houve uma diminuição na distribuição das fibras tipo II (LUGINBUHL; DUDLEY; STARON, 1984).

2.9 NADPH Oxidase: Isoformas, Ativação e Inibição

Em meados de 1990, apesar da dificuldade de métodos eficientes na quantificação de EROs, já era possível detectar sua produção em vários tipos de células. Já naquele momento, enquanto a produção das EROs era atribuída a respiração mitocondrial, testes com inibidores já mostravam possibilidades de serem as flavoproteínas, as quais são similares a gp91^{phox} presente no complexo enzimático NADPH oxidase, as maiores produtoras de EROs (LAMBETH, 2004; PETRY; WEITNAUER; GORLACH, 2010).

FIGURA 7 - Equação da produção de superóxido a partir da redução de NADPH realizado pela NADPH Oxidase

A NADPH oxidase, também conhecida como Nox, foi descoberta primeiro em neutrófilos liberando superóxidos em atividades fagocitárias (DWORAKOWSKI et al., 2006). Hoje já se conhece outras diferentes isoformas dela (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1, Duox2) localizadas nas membranas biológicas de diversos tecidos e seus estímulos de ação específicos (FIGURA 8). Sua função geral é a produção de O_2^- (FIGURA 7) (BEDARD; KRAUSE, 2007), apesar de hoje já se saber que a Nox4 pode sim também produzir H_2O_2 (SCHRODER et al., 2012).

FIGURA 8 - Isoformas da NADPH oxidase e em destaque as isoformas que são expressos no músculo esqueléticos (BEDARD; KRAUSE, 2007)

O ME expressa Nox2 e Nox4. A Nox2 conhecida como gp91^{phox} ou oxidase fagocitária por ter sido encontrada primeiro em fagócitos, se constitui do flavocitocromo b₅₅₈ formado pela gp91^{phox} e p22^{phox} associados à membrana do fagócito. Mas para sua ativação é necessário a translocação de subunidades citosólicas (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} e Rac) a membrana a fim de associar-se ao flavocitocromo b₅₅₈. A Nox4 tem mecanismos bem diferentes da Nox2 porque parece não precisar das subunidades p47^{phox}, p67^{phox} (nem das análogas descobertas recentemente: NoxO1 e NoxA1) e Rac para sua atividade. Embora existam relatos de que esta Nox requer a Rac nas suas expressões. Além disso, GTPase

também não é requerida para sua atividade (FIGURA 8), motivo pelo qual a atividade desta isoforma tem sido considerada pela medida de sua expressão (DWORAKOWSKI et al., 2006; MARTYN et al., 2006; BEDARD; KRAUSE, 2007; PETRY; WEITNAUER; GORLACH, 2010; SCHRODER et al., 2012)

FIGURA 9 - Domínio Heme e Flavina da NADPH oxidase . Adaptado de Lambeth (2004)

Apesar de pouco se saber sobre a estrutura e ativação da Nox4, muito já se apresenta na literatura sobre a Nox2. Isto inclui sua ativação que ocorre quando a GDP ligada a Rac é transformada em GTP, que por sua vez fosforila a $p47^{\text{phox}}$, subunidade organizadora, fazendo-a mudar de conformação a fim de permitir que a $p67^{\text{phox}}$, subunidade ativadora, se ligue a $p22^{\text{phox}}$ localizada na membrana. Assim, ocorre a translocação da $p47^{\text{phox}}$ junto com as outras subunidades citosólicas ($p67^{\text{phox}}$ e $p40^{\text{phox}}$) da Nox2 para membrana e a união dos componentes citosólicos aos da membrana promove a ativação desta enzima (FIGURA 10). Logo, em presença do doador de elétrons, NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida), o complexo enzimático NADPH oxidase faz a transferência de elétrons via FAD para o grupo heme, e depois para o oxigênio formando o superóxido (FIGURAS 9 e 10). Atualmente já se sabe que suas ativações e regulações sofrem influências de forças mecânicas, hormônios, citocinas, fatores metabólicos, hipóxia, proteínas quinases. Então angiotensina II (Ang II), trombina, o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), o

fator de necrose tumoral α (TNF- α), lactosilceramida, Interleucina-1, a LDL oxidada e a proteína quinase C (PKC) são capazes de ativar a NADPH oxidase (LAMBETH, 2004; DWORAKOWSKI et al., 2006; BEDARD; KRAUSE, 2007; PETRY; WEITNAUER; GORLACH, 2010; RABELO et al., 2010; KLENIEWSKA et al., 2012)

Importante mesmo é ressaltar que todos estes ativadores da NADPH oxidase trabalham num sistema que pode ser essencial para a homeostase de todo sistema ou organismo. E a diminuição da expressão ou inibição da atividade desta enzima, pode mexer em sinalizações de fundamental importância das estruturas e funções dos tecidos. Como exemplo, em cultura de células musculares lisas, sabe-se que a Ang II induz hipertrofia por vias de sinalizações das MAP quinases e AKT/PKB, e em camundongos com deficiência no gene da gp91phox, a hipertrofia cardíaca, falha mesmo em presença da Ang II (BEDARD; KRAUSE, 2007; RABELO et al., 2010).

FIGURA 10 - Esquema de ativação do complexo enzimático NADPH oxidase. Adaptado de Aldieri, et al. (2008).

Portanto, o estudo da NADPH oxidase relacionado à função muscular se torna justificável uma vez que ela é produtora de EROs que por sua vez estão relacionadas a respostas funcionais do ME, bem como estão envolvidos em sinalizações celulares do mesmo (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008; JI, 2008; POWERS; JACKSON, 2008). O envolvimento desta enzima na função muscular esquelética é até fortemente justificável quando pensamos que proximidades dos pró-oxidantes e oxidantes com moléculas alvos são bem importantes em estresse oxidativo, uma vez que as EROs facilmente se ligam a outras moléculas. E, as isoformas da NADPH oxidase no ME estão principalmente no retículo sarcoplasmático e túbulo T onde estão as proteínas do cálcio que são responsáveis também pelo sucesso da contração muscular (SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013).

2.10 Apocinina

A apocinina é uma acetofenona (4-hydroxy-3-methoxyacetophenone) que cristaliza em água e, é mais solúvel em temperaturas mais elevadas na água, álcool, benzeno, cloroformio e éter (VAN DEN WORM, 2001). A mesma também vem sendo muito usada no tratamento de doenças associadas à inflamação crônica onde há inibição de produção de superóxido pela NADPH oxidase fagocitária e não fagocitária (VEJRAZKA; MICEK; STIPEK, 2005; STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008), chegando até a ser usada por inalação em pacientes humanos com enfisema pulmonar sem que tivesse efeitos colaterais (LAFEBER et al., 1999).

Conhecida também como acetovanillone, a apocinina foi primeiro descrita em 1883 sendo encontrada em raiz de uma planta têxtil canadense, *Apocynum Cannabinum*, e usada como remédio para doenças cardíacas e edemas. Em 1971 a encontraram também em raiz de outra planta nativa da Índia, Nepal, Tibete e Paquistão chamada *Picrorhiza Kurroa* onde também se tornou um remédio tradicional na Índia (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008). Mas foi em 1990 que a apocinina ganhou a fama de inibidor da produção de O_2^- e também por exercer um papel anti-inflamatório (ALDIERI et al., 2008).

Como a produção de superóxido está envolvida com diversas patologias como aterosclerose, diabetes, infarto de miocárdio, insuficiência cardíaca, e em especial, já se sabe que a atividade deste complexo enzimático NADPH oxidase por vezes está aumentada em doenças como as cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, artrite reumatóide, sepse,

dentre outras, surgiu o interesse em estudar seus inibidores para uso terapêutico dessas patologias. Dentre outros, por ser mais específico, o inibidor 4-hydroxy-3-methoxyacetophenone (apocinina) tem sido o mais popular de uma lista de outros inibidores comuns como: iodóniodifenileno (DPI), 4-(2-Aminoethyl)denzenesulfonylfluoride (AEBSF), Neupterina, gp91ds-tat, (DWORAKOWSKI et al., 2006; BEDARD; KRAUSE, 2007; RABELO et al., 2010; AL GHOULEH et al., 2011).

O DPI é o mais comum dos inibidores de NADPH oxidase. No entanto ele pode interagir com transportadores de elétrons diversos e no caso desta enzima em questão, não se sabe ainda se ela interage com o grupo flavina ou com o grupo heme, o que o torna um inibidor inespecífico (BEDARD; KRAUSE, 2007).

A AEBSF é uma protease de serinas. E sendo assim ela pode interferir em outras proteínas não envolvidas com a NADPH oxidase. Este inibidor parece interferir em associações da $p47^{\text{phox}}$, porém há dúvidas sobre como de fato ela age como inibidora da NADPH oxidase, se o mecanismo é direto ou nas vias de sinalizações de ativação desta subunidade (BEDARD; KRAUSE, 2007).

O inibidor neupterina é gerado por macrófagos e talvez fosse uma boa opção por ser natural do organismo. No entanto, além de ter bastantes indícios de aumentar EROs no ambiente celular, ele não é específico e pode inibir a xantina oxidase (WEDE et al., 1998; BEDARD; KRAUSE, 2007).

O gp91ds-tat foi desenvolvido para inibir a Nox2. Este peptídeo imita a sequência da Nox2, mas a região alvo deste peptídeo tem também em outras Nox, o que faz dele um inibidor inespecífico. Isto é tão evidente que no sistema vascular, onde há predomínio de Nox1 e Nox4, ele é considerado um potente inibidor de produção de superóxido (BEDARD; KRAUSE, 2007).

Como inibidor da NADPH oxidase, a apocinina apareceu interferindo na ativação desta enzima por meio de um impedimento do deslocamento da subunidade citosólica $p47^{\text{phox}}$ para ligar-se a componentes que ficam na membrana ($gp91^{\text{phox}}$ + $p22^{\text{phox}}$). Este bloqueio interfere no processo normal para ativação de todo este complexo enzimático (FIGURA 12). Para que isso aconteça, a apocinina se utiliza de um mecanismo que possibilita a formação de um dímero por meio de oxidação com ajuda de uma peroxidase que são enzimas oxirredutoras que utilizam o peróxido de hidrogênio como molécula aceptora de elétrons (FIGURA 11). Essa reação faz a apocinina ficar oxidada e capaz de oxidar tióis da NADPH oxidase (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).

Alguns estudos relatam sobre uma possível ação de varredura da apocinina sobre EROs em células fagocitárias. No entanto, a apocinina não varreu o O_2^- produzido pela xantina oxidase. E apesar de no mesmo estudo ficar claro uma varredura de H_2O_2 , e os autores (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008) interpretarem que isso reforça que a ação da apocinina pode não se limitar a inibição da NADPH oxidase, é importante ressaltar que estudos recentes mostram algumas isoformas deste complexo enzimático, como a Nox4, produzindo também o peróxido de hidrogênio (MARTYN et al., 2006; SCHRODER et al., 2012)

FIGURA 11 - Formação do dímero de apocinina que impede a ligação das subunidades citosólicas com o citocromo 558 localizado nas membranas celulares (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).

Também existem alguns relatos de que a apocinina possa induzir estresse oxidativo em outros tipos de células. No entanto quando há atividade da NADPH oxidase, seu efeito inibidor prevalece (VEJRAZKA; MICEK; STIPEK, 2005). E se de fato é verdade o que sugerem (SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013), que em situação de exercício a atividade da NADPH oxidase aumenta, o efeito inibidor da apocinina pode sim prevalecer sobre o de indutor de estresse oxidativo. Até porque, apesar da atividade da mieloperoxidase (MPO), que é uma peroxidase, não estar aumentada no ME como resposta ao exercício de corrida prolongado no estudo de (BELCASTRO A. N.; ARTHUR G. D.; ALBISSER T. A.; AI, 1996), uma sessão de exercício intenso até a exaustão foi capaz de aumentar a concentração de MPO 24h após o exercício em músculo oxidativo como o sóleo (MOROZOV et al., 2006).

Neste último estudo, (SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013) investigaram a produção de superóxido por oxidação de dihidroetidina (DHE) em fibras isoladas e tratadas com apocinina durante repouso e sob estimulação elétrica. De fato foram encontradas reduções da oxidação de DHE de ~10% em condições de repouso e ~70% nas que sofreram estimulação. Pelo fato da apocinina apresentar outros efeitos de oxidante e/ou antioxidante em outras situações e células, os mesmos pesquisadores também investigaram esta resposta com um inibidor mais específico da NADPH oxidase. Então, o gp91ds-tat, também inibidor da NADPH oxidase, foi utilizado e respostas semelhantes as do tratamento com apocinina foram encontradas. Isto levou a conclusão de que o efeito redutor da produção de superóxido em fibras musculares tratadas com apocinina se dava por ação inibitória.

FIGURA 12 - Mecanismo de inibição da Nox 2 pela apocinina (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).

Mesmo com a sugestão de utilizar outros inibidores, a apocinina se apresentou como uma boa opção para o estudo *in vivo*, principalmente por seu grau de baixa toxicidade.

Isto permite a administração da mesma por períodos mais longos, característicos de tratamentos e protocolos crônicos com animais, e com doses até maiores (ALDIERI et al., 2008). Além disso, (PETRONIO et al., 2013) estudaram efeitos da ingestão oral de apocinina investigando sua interação com albumina que é uma proteína abundante na circulação sanguínea e transportadora de componentes endógenos e exógenos. Os mesmos concluíram que a apocinina não alterava a estrutura desta proteína além de poder ser transportada pela mesma.

Portanto, no presente estudo, esperava-se que a atividade da NADPH oxidase estivesse aumentada em função do treinamento físico, que a administração de apocinina pudesse inibir esta enzima durante um protocolo de treinamento aeróbico intervalado intenso, e que as adaptações musculares esqueléticas induzidas por este tipo de treinamento fossem alteradas (FIGURA 13).

FIGURA 13 -. Esquema hipotético da inibição com apocinina do mecanismo de produção de EROs pela da ativação da NADPH oxidase induzida pelo TFII, nas adaptações músculo esqueléticas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o impacto da inibição do complexo enzimático NADPH oxidase nas adaptações do estado redox, da estrutura e da função contrátil dos músculos esqueléticos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL), induzidas pelo treinamento físico intervalado intenso em ratos.

3.2 Específicos

Avaliar os efeitos da administração de apocinina (inibidor da NADPH oxidase) durante o período de treinamento físico intervalado intenso nas seguintes variáveis dependentes, comparado com os ratos treinados não tratados e ratos sedentários:

- Massa corporal (delta pré e pós-intervenção);
- Capacidade funcional: potência aeróbica ($\text{VO}_2\text{máx}$) e tolerância ao exercício progressivo até exaustão;
- Função contrátil *ex vivo* do músculo esquelético (Força máxima e fadiga);
- Massa e estrutura dos músculos sóleo e EDL: área de secção transversa (AST), capilarização e distribuição percentual dos tipos de fibras;
- Bioquímica do músculo esquelético:
 - Atividade pró-oxidante: NADPH oxidase;
 - Atividade antioxidante: enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT);
 - Estado redox: razão glutatona reduzida: oxidada (GSH:GSSG).
 - Lesões oxidativas: hidroperoxidação lipídica e carbonilação de proteínas

4. MÉTODOS

4.1 Amostra e Manipulação dos Animais

Foram utilizados 56 ratos machos (Wistar) com 3 meses de idade no início do experimento. Os ratos foram alojados em gaiolas (5 animais) no biotério da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP), temperatura ambiente controlada entre 22-23°C adotando-se ciclo claro/escuro invertido (início do ciclo escuro às 7h e do claro às 19h). Os ratos receberam água e ração para roedores (Nuvilab, Nuvital S/A, Brasil) *ad libitum* e foram pesados semanalmente em balança digital (Gehaka, BG 8000). A utilização de animais neste projeto de pesquisa seguiu o protocolo do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (2012/02).

4.2 Desenho Experimental

O quadro a seguir (Quadro 2) mostra o planejamento do experimento, onde foi possível visualizar a constituição dos grupos experimentais de acordos com os dois fatores estudados (variáveis independentes): fator tratamento farmacológico com dois níveis fixos: controle sem tratamento (C) e tratado com apocinina (A) e fator exercício físico com dois níveis fixos: sedentário (S) e treinamento intervalado intenso (T). Foram estudados 14 ratos em cada grupo (n total = 56).

QUADRO 2 - constituição dos grupos experimentais

	C	A
S	CS (n=14)	AS (n=14)
T	CT (n=14)	AT (n=14)

Onde: (C) = Controle; (A) = Apocinina; (S) = Sedentário; (T) = Treinado

4.3 Sequência dos Procedimentos Experimentais

Após o recebimento, os ratos foram aclimatados ao biotério (uma semana) e distribuídos aleatoriamente nos 4 grupos experimentais (CS, CT, AS e AT). Na semana seguinte, todos os ratos foram adaptados à corrida na esteira rolante e em seguida realizaram o teste para determinação da potência aeróbica ($VO_2\text{máx}$). Na 3ª semana, os grupos treinados (CT e AT) foram submetidos ao protocolo de treinamento intervalado intenso (8 semanas) enquanto os grupos sedentários (CS e AS) foram apenas manipulados no ambiente de treino. Durante o período de 8 semanas, todos os ratos receberam diariamente o tratamento farmacológico (gavagem gástrica) correspondente ao grupo inserido: controle ou apocinina.

FIGURA 14 - Sequência dos procedimentos experimentais utilizados com os animais *in vivo*.

Ao final deste período, os ratos foram sacrificados (48 horas após a última sessão de treino ou sedentarismo) para a retirada e análise morfológica, funcional e bioquímica dos tecidos. A sequência dos procedimentos de manipulação com os animais *in vivo* estão descritos na FIGURA 14 e os protocolos dos procedimentos experimentais serão descritos a seguir.

4.4 Protocolo do Teste para Determinação da Potência Aeróbica ($VO_2\text{máx}$)

Inicialmente, todos os ratos foram adaptados ao ambiente de teste e à corrida na esteira dentro da caixa metabólica, durante 10min/dia por 3 dias, em velocidades alternadas

entre 6 e 9m/min. Posteriormente, os ratos foram submetidos, individualmente, a um protocolo de teste progressivo de corrida com velocidade inicial de 6 m/min e incremento de 3 m/min a cada 3min, inclinação constante de 20°, até a exaustão (adaptado de FERREIRA et al., 2007) e realizado durante o ciclo escuro dos animais num ambiente com temperatura controlada entre 22 e 23°C.

O sistema para medida do VO_2 durante o teste de corrida é constituído por uma esteira rolante instalada dentro de uma caixa metabólica, a qual está conectada a um analisador de oxigênio e dióxido de carbono (Sable Systems SS3, FC-10a O_2/CO_2 analyzer) e a uma bomba de vácuo ajustada para um fluxo de ar ambiente dentro da caixa igual a 3.500 mL/min. O sistema foi calibrado antes de cada teste com ar ambiente (fração inspirada de oxigênio igual a 20,93%), e o VO_2 foi dado em $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e calculado a cada minuto de teste utilizando-se a seguinte equação: $\text{VO}_2 = [\text{fluxo de ar} \times (\text{Fi } \text{O}_2 - \text{Fe } \text{O}_2)] / \text{massa corporal}$

Onde:

Fluxo de ar = 3.500 mL/min

$\text{Fi } \text{O}_2$ = fração de oxigênio inspirada (ar ambiente)

$\text{Fe } \text{O}_2$ = fração de oxigênio expirada (caixa metabólica)

Massa corporal do rato = g

Posteriormente, os dados de VO_2 foram plotados em função da velocidade de corrida e foi feita uma regressão linear (VO_2 x velocidade) para determinação dos parâmetros de VO_2 em repouso ($\text{VO}_{2\text{rep}}$), nas diferentes velocidades submáximas e no exercício máximo ($\text{VO}_{2\text{máx}}$). Assim, a partir da regressão linear foram determinadas as velocidades de corrida correspondentes às intensidades relativas de 40%, 60% e 85% do $\text{VO}_{2\text{máx}}$, que foram utilizadas no treinamento físico.

O teste para determinação do $\text{VO}_{2\text{máx}}$ foi realizado em 3 momentos durante todo o protocolo experimental: pré-treinamento (para definição da velocidade de treino), 4ª semana de treinamento (para ajuste da velocidade de treino) e pós-treinamento para verificação dos efeitos dos tratamentos empregados. Os ratos dos grupos sedentários (CS e AS) realizaram apenas dois testes (pré- e pós-treinamento) para avaliação do efeito do sedentarismo na potência aeróbica dos animais.

4.5 Protocolo de Treinamento Físico Intervalado Intenso (TFII)

Os ratos dos grupos treinados (CT e AT) foram submetidos a um protocolo de TFII de corrida com intensidade relativa média igual a 75% $VO_{2m\acute{a}x}$, durante 8 semanas, realizado 5 vezes/semana (2ª a 6ª feira) e duração de 60min (WISLOFF; ELLINGSEN; KEMI, 2009).

O TFII foi realizado em esteira adaptada para roedores situada dentro do biotério, no período escuro e teve início pelo menos 1h após o tratamento com água ou solução de apocinina, dependendo dos grupos em que estavam inseridos (CT ou AT respectivamente). Cada sessão de treino teve duração total de 60min: 6min de aquecimento (velocidade correspondente a 40% $VO_{2m\acute{a}x}$), seguido de 49min com intensidade intervalada (7 séries de 7min) sendo cada série constituída por 3min a 60% $VO_{2m\acute{a}x}$ e 4min a 85% $VO_{2m\acute{a}x}$, finalizando com 5min de recuperação ativa a 40% VO_{2max} , numa inclinação constante de 20 graus.

Os ratos dos grupos sedentários foram colocados diariamente na esteira rolante, sem realizarem o exercício, para vivenciarem o mesmo estresse ambiental e de manipulação que os ratos treinados.

4.6 Protocolo de Tratamento Oral com Apocinina

A apocinina (Sigma-Aldrich, USA), inibidor do complexo enzimático NADPH oxidase, foi administrada diariamente numa dose de 30 mg/Kg/dia (HAYASHI et al., 2005; PECHANOVA; JENDEKOVA; VRANKOVA, 2009; OELZE et al., 2011), por gavagem gástrica (1ml) (FIGURA 15), a fim de garantir uma mesma dose a cada rato, pelo menos 1 hora antes de cada sessão de treino (2ª a 6ª feira), durante o período de 8 semanas.

A solução de apocinina foi preparada diariamente e imediatamente antes de sua administração aos grupos tratados (AS e AT), em água filtrada e ligeiramente aquecida para solubilização da mesma.

Os ratos dos grupos controle (CS e CT) receberam também por gavagem gástrica e diariamente, 1mL de água filtrada e aquecida.

FIGURA 15 - Animal sendo tratado com agulha de gavagem gástrica.

4.7 Sacrifício e Coleta dos Tecidos

Os ratos foram sacrificados por decapitação 48h após a realização do teste de VO_2 máx, a fim de minimizar os efeitos agudos do exercício. Logo após o sacrifício, foram retirados os músculos esqueléticos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL).

Um músculo esquelético foi imediatamente preparado para avaliação da função contrátil *ex vivo*. Os outros tecidos foram pesados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C , para posteriores análises bioquímicas.

Os músculos esqueléticos que foram encaminhados a análise estrutural foram banhados em solução (O.C.T. compound containing / TISSUE-TEK), congelados em isopentano e armazenados em nitrogênio líquido para análises histológicas posteriormente.

4.8 A Avaliação da Função Contrátil *ex vivo* do Músculo Esquelético

4.8.1 Preparação do Músculo e Fixação no Banho de Órgãos

O músculo destinado a análise funcional *ex vivo* foi cuidadosamente dissecado e suas duas extremidades (tendões) foram amarradas com linha cirúrgica e montadas em um banho de órgãos, AVS projetos (São Paulo, Brasil), para análise da função contrátil *ex vivo*. A extremidade distal foi fixada num gancho fixo dentro de uma cuba de vidro (25 mL), contendo solução de Krebs aerada com solução carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2), e a

extremidade proximal foi fixada a um transdutor de força isométrica (TIM-200; 0-200 g), conectado a um sistema computadorizado para aquisição e registro das propriedades contráteis do músculo (AVS projetos, São Paulo Brasil).

A solução de Krebs teve a seguinte composição (em mM: 137 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 H₂O, 1 MgSO₄, 24 NaHCO₃, 11 glicose), o pH foi ajustado para 7,4, semelhante ao do plasma sanguíneo (WOOTEN, 2003), temperatura controlada de 25°C, para evitar concentrações de EROs devido a altas temperaturas (EDWARDS et al., 2007). A solução carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) serviu de aporte de oxigênio ao músculo durante o experimento e agente de tamponamento da solução mantendo o pH da mesma durante todos os procedimentos que antecederam e perduraram à avaliação (GLASS, ADInstrumentsPty Ltd). A solução de Krebs foi preparada no dia do experimento para evitar proliferação de microorganismos e/ou formação de precipitados de fosfato de cálcio.

4.8.2 Sistema de Estimulação Elétrica e Registro da Força Muscular Isométrica

Os músculos foram estimulados eletricamente, por eletrodos inseridos dentro da cuba, para que ocorresse a contração sem alteração do comprimento do músculo (contração isométrica), utilizando-se um estimulador elétrico (AVS-100) e um amplificador (AECAD 04F), ambos da AVS projetos (São Paulo, Brasil), controlado por um sistema computadorizado, para gerar pulso de estímulos elétricos de acordo com os protocolos desejados. O software AQCDA (AVS, Solução Integrada Ltda., Brasil) foi utilizado para o controle da estimulação elétrica, o registro e a análise das tensões geradas pelo músculo.

Estudos prévios do laboratório caracterizaram, para o sistema e os músculos que foram utilizados, os parâmetros de estimulação elétrica (pulsos elétricos com 0,2 ms de duração e 80 V de intensidade), capazes de mimetizar os padrões de ativação muscular *in vivo*.

Inicialmente, para que todos os músculos fossem avaliados a partir de uma mesma condição inicial, foi definido o comprimento muscular inicial capaz de gerar a maior força de contração isométrica (Lo). Para tal, o músculo foi estimulado e estirado (1 mm) a cada intervalo de 2min, ao longo de mais ou menos 20min, até atingir a força máxima de contração. Este comprimento inicial (Lo) foi mantido durante todo o experimento e protocolos a seguir, sendo apenas trocado a solução de Krebs logo após cada protocolo e deixado um tempo de 20min de estabilização.

As respostas (tensões) absolutas aos estímulos foram corrigidas pelo valor da área de secção transversa (AST) do músculo, resultando no valor da força específica. A AST foi calculada pela seguinte fórmula: $AST = [Massa \text{ do músculo (g)} / [Comprimento \text{ ótimo das fibras musculares (mm, obtido através do produto do valor do comprimento ótimo do músculo por } 0,69 \text{ para o Sóleo e } 0,48 \text{ para o EDL)} \times \text{Densidade do músculo Esquelético (valor assumido de } 1,06 \text{ mg/mm}^3)]$ (ENG et al., 2008).

4.8.3 Protocolos de Avaliação Curva Força x Frequência

Neste protocolo, o músculo foi avaliado em sua capacidade de gerar força, sendo submetidos a um protocolo para construção de uma curva força x frequência com estímulos de 80 V em 0,2 ms a cada 3min em progressão nos valores de frequência (10, 20, 30, 50, 80, 100 e 150 Hz) e com trens de pulso de 1200 ms para o músculo sóleo e 350 ms para o músculo EDL.

4.8.4 Protocolo de indução à fadiga

Neste protocolo, cada músculo foi submetido a um protocolo de resistência a fadiga no qual o mesmo estímulo (80 V) durante 0,2 ms foi aplicado a uma frequência alta de 150 Hz a cada 5 segundos, durante um período de 4min e 30 segundos. A queda na capacidade de gerar força foi considerada como parâmetro de fadiga de cada tecido.

FIGURA 16 - Representação do protocolo de fadiga com estimulações a cada 5 segundos no software de análise de função muscular *ex vivo* no aparelho do banho de órgãos

4.9 Análises da Estrutura da Musculatura Esquelética

Após o sacrifício, os músculos sóleo e EDL foram dissecados e extraídos e fixados em massa a base de *tissue tek*. Em seguida os músculos foram previamente congelados por 60s no *isopentano* gelado em nitrogênio, e posteriormente congelados e armazenados em nitrogênio líquido até serem realizados os cortes histológicos e montagem em lâminas de vidro para visualização em microscópio.

4.9.1 Determinação da área de secção transversa (AST) e distribuição de tipos de fibras no músculo esquelético

A determinação da AST e distribuição dos tipos de fibras foram determinadas pelo método de histoquímica da ATPase miosínica, pois, o mesmo nos permite identificar os tipos de ATPases da miosina, bem como medir a área do fibra muscular.

FIGURA 17 - Fotos de cortes histológicos analisados pela atividade da miosina ATPase em pH básico (pH=10.3) dos músculos sóleo em (A) e EDL em (B).

Os músculos congelados em nitrogênio foram levados ao criostato, mantido a uma temperatura de -22°C , com o fim de serem cortados de maneira transversal (10 μm).

Posteriormente, as lâminas contendo os cortes foram incubados em soluções de pH (10.3) para determinar a atividade da miosina ATPase. Neste pH, a miosina ATPase das fibras de contração lenta (tipo I) é inativada, permitindo que as fibras de contrações mais rápidas mudem a coloração quando novamente incubadas em solução alcalina contendo ATP e cálcio. Desta forma, ocorrerá a ativação da miosina ATPase da fibra de contração rápida (tipo II) desencadeando a produção de fosfato Inorgânico (Pi), o qual precipita na solução alcalina e possibilita a sua visualização de cor preta ou castanho escuro (Figura 17) (JONES, 2004; JUNQUEIRA, 2008).

Em seguida os cortes foram analisados, as capturas de imagens foram feitas por magnificação de 200x, a objetiva de 20x e registrada num computador acoplado ao sistema de vídeo e utilizando um programa de captura e análise das imagens (LeicaQwin, Bensheim-Alemanha), permitindo a determinação da área de secção transversa e do percentual de distribuição dos tipos de fibras musculares (tipo I e tipo II) (BROOKE; KAISER, 1970).

4.9.2 Razão capilar por fibra do músculo esquelético

A quantificação dos capilares nos músculos esqueléticos foi feita a partir do método de histologia que utiliza ácido periódico e Schiff (PAS). A técnica com PAS é normalmente utilizada para identificar partes teciduais que contém moléculas com alta porcentagem de carboidrato. Por este método, as sessões de tecidos, que contém grande quantidade deste componente energético, são oxidadas pelo ácido periódico, o qual as lâminas foram incubadas por 10min, desencadeando a formação de grupos de aldeídos. Estes últimos são detectados pelo reagente Schiff, onde as lâminas também foram incubadas, agora por 30min, marcando as membranas basais dos capilares intramusculares de cor vermelha, tornando possível a visualização destas circundando a luz do capilar em branco.

Os cortes histológicos (10um) também foram realizados no criostato em temperatura de -22°C. A captura de imagens dos cortes foi feita por magnificação de 200x com objetiva de 40x e registrada num computador acoplado ao sistema de vídeo e utilizando um programa de captura e análise das imagens (LeicaQwin, Bensheim-Alemanha). Foram fotografadas cinco fotos (campos) de cada músculo para cada rato. A razão capilar foi dada por fibra, dividindo o número total de capilares pelo número total de fibras contabilizadas na mesma foto (campo).

4.10 Avaliação do Balanço Redox no Músculo Esquelético

Para análise do balanço redox, os músculos esqueléticos foram avaliados quanto às vias de produção de espécies reativas de oxigênio, atividade do sistema antioxidante e danos oxidativos, descritos a seguir.

4.10.1 Atividade do Complexo Enzimático NAD(P)H Oxidase

A atividade da NADPH oxidase foi avaliada pela fração de membrana dos músculos esqueléticos dos ratos, pela medida da produção de superóxido. A presença de superóxido foi identificada por luminescência adquirida da reação do superóxido com lucigenina.

Inicialmente, os músculos esqueléticos foram homogeneizados das amostras de músculos esqueléticos (~100mg), numa concentração de 1:10 em tampão de lise (50mM Tris-HCl, 0,1% Mercaptoetanol, 0,01mM ácido dietileno triamina penta-acético (DTPA), Inibidor de protease). As amostras homogeneizadas foram sonicadas (3x 10s de 8w), em seguida centrifugados (18000g, 15min, 4°C) e os sobrenadantes ultracentrifugados (33000rpm, 1h, 4°C). A fração de membrana foi o pellet resultado da ultracentrifugação que foi suspenso no mesmo tampão de lise (JANISZEWSKI et al., 2002).

O conteúdo de superóxido nas frações de membranas foi medido utilizando 20 - 25ug de proteínas em solução de 1ml (10μM EDTA; 0,1μM lucigenina; 300μM de NADPH, em PBS) no luminômetro. Os resultados foram analisados pela inclinação da curva dos valores de unidades de luminescência por miligrama de proteína por minuto (RLU/mg/min).

4.10.2 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da enzima antioxidante SOD no homogeneizado dos músculos foi determinada pela inibição da redução do citocromo C por O_2^- gerados pela enzima XO, que foi acrescentada ao ensaio. Essa inibição se deu pela competitividade da SOD (presente na amostra) com o citocromo C pelo O_2^- produzidos pela XO (MCCORD; FRIDOVICH, 1969).

Os músculos esqueléticos foram homogeneizados em tampão fosfato (50mM 1mM EDTA, pH 7,4) e centrifugados em 12000g durante 15min e a 4°C. A taxa de redução do citocromo C foi medida de uma solução (19mM de citocromo C, 1,18mM de xantina,

concentração de XO ajustada para uma velocidade de redução de citocromo C de 0,025UA/min e diluídos em tampão fosfato a 0,05 M e pH 7,8) na ausência de amostra e em absorbância de 550nm por 5min. Em seguida, a taxa de redução do citocromo C será acompanhada durante 5min em presença da amostra diluída na solução supracitada. A atividade da SOD foi calculada pela diferença entre a taxa de oxidação do citocromo C na ausência e na presença de amostra. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

4.10.3 Atividade da Enzima Catalase

A atividade da enzima antioxidante CAT foi determinada pela decomposição do substrato peróxido de hidrogênio (H_2O_2) acompanhada em espectrofotômetro (240nm). Os músculos primeiramente foram homogeneizados em tampão fosfato (50mM PBS, pH 7,4+ 1nM EDTA) e centrifugados a 12000g durante 15min a 4°C. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante (composto citosólico das amostras) para compor o ensaio de análise da atividade da CAT. O H_2O_2 foi adicionado a este ensaio resultando na concentração de 10mM. Em seguida a absorbância foi acompanhada por 4min e o resultado baseado na queda de absorbância que corresponderá à atividade da CAT da amostra. Os resultados foram expressos em delta Abs/min/mg de proteína (WEYDERT; CULLEN, 2010).

4.10.4 Índice de Peroxidação Lipídica

A medida dos hidroperóxidos lipídicos foi feita baseada na oxidação de íons ferro Fe^{2+} em Fe^{3+} pelos hidroperóxidos lipídicos presentes na amostra. Em condições ácidas, a reação de Fe^{3+} com o corante alaranjado de xilenol (xilenol Orange) resulta na formação de um composto com pico de absorbância em 560nm.

Então, os músculos inicialmente foram homogeneizados em tampão fosfato (50mM PBS, pH 7,4 + 1mM EDTA) e centrifugados a 12000g durante 15min a 4°C. Proteínas solúveis foram precipitadas por incubação em 10% ácido tricloroacético (massa:volume) e subsequente centrifugação (12000g, 15min, 4°C). Em seguida, a porção sobrenadante foi incubada com solução (proporção 1:9) contendo sulfato de amônio e ferro (II) (250 μ M), alaranjado de xilenol (100 μ M), ácido sulfúrico (25mM), hidroxitoluenobutilado (4mM e metanol (90% v:v), durante 30min em temperatura ambiente, e posteriormente, a absorbância da mistura foi lida em 560nm (NOUROOZ- ZADEH, 1994)

A quantidade de peróxidos lipídicos nas amostras foi então calculada com base na absorbância apresentada por concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio, diluído na solução supracitada. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

4.10.5 Carbonilação de Proteínas

Depois de homogeneizados em tampão fosfato (50mM PBS, pH 7,4 + 1mM EDTA) numa proporção 1:5 (massa:volume) e centrifugados (12000g, 15min, 4°C), retirou-se o sobrenadante (composto citosólico). Em seguida, como descrito no Kit Oxiblot de detecção de oxidação de proteínas (Milli express), 50µg deste composto foi incubado com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) por 15min para reagir com grupos carbonilas das proteínas e formar ligações covalentes. Na sequência, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel (10% acrilamida) e transferidas para membranas de nitrocelulose. Depois do bloqueio das ligações inespecíficas do anticorpo por incubação com albumina (BSA – 1%), as membranas foram incubadas com anticorpo primário contra dinitrofenil (DNP) por 1 hora, em temperatura ambiente, com BSA a 1%, 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20 e pH 7,6. Posteriormente, as membranas foram reconhecidas por anticorpo secundário conjugado à enzima HRP (horse radish peroxidase) para detecção pelo programa quantity one aparelho chemidoc (BIORAD) e quantificação pelo programa Imag J.

4.10.6 Estado Redox da Glutathiona

Para avaliar o estado redox muscular, foram identificados os níveis totais de glutathiona, principal agente redutor celular, utilizamos um kit de detecção fluorescente (GlutathioneFluorescentDetection Kit, Arbor Assays LLC, EUA).

Para preparação das amostras, aproximadamente 15mg dos músculos foram homogeneizados em tampão fosfato gelado (100mM, pH 7) e centrifugados a 14000rpm por 10min a 4°C. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com um volume igual de ácido sulfosalicílico (5%) gelado. Este kit permitiu quantificar a concentração de glutathiona reduzida (GSH) inicial, e depois transformar a glutathiona oxidada (GSSG) das amostras na forma reduzida para nova leitura de GSH totais. Os valores de GSSG foram as diferenças das GSH totais menos as GSH iniciais (GSH totais - GSH iniciais), e a apresentação dos dados se deram pela razão da concentração de GSH inicial pela concentração de GSSG (razão GSH:GSSG).

Os níveis de GSH foram avaliados por fluorescência (λ_{exc} 390 nm, λ_{em} 510 nm) em espectrofluorímetro de placa de 96 poços (Wallac Victor2 1420-Multilabel Counter, Perkin Elmer TM, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

4.11 Análise Estatística

As variáveis dependentes: massa corporal, capacidade funcional do rato (tolerância ao exercício), estrutura muscular (capilarização, mudanças de tipos de fibras, AST), função muscular (força muscular isométrica e fadiga muscular) e bioquímica muscular foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de dois fatores (variáveis independentes): fator tratamento farmacológico com dois níveis fixos: controle sem tratamento (C) e tratado com apocinina (A) e fator exercício físico com dois níveis fixos: sedentário (S) e treinamento físico intervalado intenso (T). Foi realizado o post hoc de Tukey com um nível de significância estatística $p < 0,05$. Apenas para a potência aeróbica, foi utilizada ANOVA para medidas repetidas e post hoc de Bonferroni.

5. RESULTADOS

A seguir, serão descritos os resultados das características morfofuncionais e bioquímicas dos ratos submetidos aos protocolos de treinamento físico intervalado intenso (TFII), tratamento com apocinina, e TFII associado a apocinina. Todos os resultados serão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média dos seguintes grupos experimentais: controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT).

5.1 Massa Corporal

Os valores da massa corporal (MC) dos ratos durante o protocolo experimental, avaliada pelo delta MC final menos MC inicial (Δ MC), são mostrados na TABELA 1.

TABELA 1- Massa corporal e massa dos músculos sóleo e plantar dos ratos.

	CS	CT	AS	AT
Δ MC (g)	88 $\pm$ 4,9	64 $\pm$ 3,5*	79 $\pm$ 4,1	67 $\pm$ 4,1
MMS/MC (mg/g)	0,435 $\pm$ 0,02	0,447 $\pm$ 0,02	0,424 $\pm$ 0,01	0,485 $\pm$ 0,01 #
MME/MC (mg/g)	0,404 $\pm$ 0,01	0,441 $\pm$ 0,02	0,434 $\pm$ 0,01	0,467 $\pm$ 0,01*

Delta da massa corporal final e inicial (Δ MC), massa muscular do sóleo relativa à massa corporal (MMS/MC) e massa muscular do EDL relativa a massa corporal (MME/MC) dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de uma estatística ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Turkey, onde: * $p < 0,05$ vs. CS; # $p < 0,05$ vs. AS.

O TFII reduziu significativamente (-19%) o ganho de massa corporal no grupo CT comparado ao grupo CS (TABELA 1). No grupo sedentário, a apocinina não influenciou significativamente o Δ MC nos ratos sedentários, onde os valores do grupo AS foram semelhantes aos do CS. Além disso, a apocinina associada ao TFII impediu a redução no ganho de peso induzida pelo TFII.

5.2 Massa Muscular Esquelética

A TABELA 1 mostra os valores da massa muscular relativa à massa corporal dos músculos sóleo (MMS/MC) e EDL (MME/MC), obtidos ao final do protocolo experimental.

Sóleo: o TFII não modificou a MMS/MC do grupo CT comparado com o grupo CS. Nos grupos sedentários, a apocinina também não modificou a MMS/MC do grupo AS comparado ao CS. Por outro lado, a apocinina associada ao TFII aumentou significativamente a MMS/MC do grupo AT comparado ao grupo AS (TABELA 1).

EDL: o TFII não modificou a MME/MC do grupo CT quando comparado com o grupo CS. Nos grupos sedentários, a apocinina não modificou a MME/MC do grupo AS comparado ao CS. Além disso, entre os grupos treinados (CT e AT) não houve diferença na MME/MC. No entanto, a apocinina associada ao TFII aumentou significativamente (+16%) a MME/MC do grupo AT comparada ao grupo CS (TABELA 1).

5.3 Tolerância ao Exercício Progressivo

A FIGURA 18 demonstra os resultados da tolerância ao exercício, representada pela distância total percorrida no teste de exercício progressivo até a exaustão, realizado nas fases pré e pós-protocolo. Os valores são expressos como delta da distância total percorrida (distância pós menos distância pré-protocolo).

Como esperado, o TFII aumentou significativamente a tolerância ao exercício em ambos os grupos treinados, CT (+142m) e AT (+171m) (FIGURA 18). Por outro lado, nos grupos sedentários, a tolerância ao exercício diminuiu na fase pós-tratamento, evidenciado por valores negativos do delta, CS (-156 m) e AS (-101m). Além disso, a apocinina associada ao TFII não alterou a resposta de aumento da tolerância induzido pelo efeito do treinamento.

FIGURA 18 - Tolerância ao exercício progressivo, expressa como delta da distância total percorrida (pós menos pré-protocolo), dos grupos controle sedentário, controle treinado, apocinina sedentário e apocinina treinado. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois fatores, seguida de post hoc de Turkey, onde: * $p < 0,05$ vs. CS e AS.

5.4 Potência Aeróbica

A FIGURA 19 mostra os resultados da potência aeróbica, expressa pelo consumo máximo de oxigênio ($VO_{2\text{máx}}$) obtido no teste de exercício progressivo até a exaustão, realizado nas fases pré e pós-protocolo.

O $VO_{2\text{máx}}$ foi significativamente menor na fase pós-tratamento em ambos os grupos sedentários, CS (- 41%) e AS (-23%), comparados com a fase pré-tratamento. Por outro lado, como esperado, o TFII foi capaz de prevenir a redução do $VO_{2\text{máx}}$ em ambos os grupos CT e AT. Além disso, a apocinina associada ao TFII não modificou o efeito do treinamento sobre a capacidade aeróbica.

FIGURA 19 - Consumo máximo de oxigênio (VO₂máx) obtido no teste máximo de esforço, realizado nas fases pré e pós-protocolo, dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois fatores com medidas repetidas, seguida de post hoc de Bonferroni.

5.5 Capilarização Muscular

A seguir são demonstrados os resultados da capilarização dos músculos sóleo e EDL, expressa pela razão número de capilares pelo número de fibras musculares (razão capilar/fibra).

Sóleo: o TFII aumentou significativamente (+82%) a razão capilar/fibra no grupo CT comparado ao grupo CS (FIGURA 20A). No grupo sedentário, a apocinina não modificou a razão capilar/fibra, sendo semelhantes os valores dos grupos AS e CS. No entanto a apocinina associada ao TFII inibiu parcialmente o aumento da razão capilar/fibra induzida pelo TFII, sendo o aumento de apenas 22 % (N.S.) no grupo AT comparado ao grupo CS ao invés de 82% ($p < 0,05$) do CT comparado ao AS.

EDL: o TFII aumentou significativamente a razão capilar/fibra no grupo CT (+50%) comparado ao grupo CS (FIGURA 20B). No grupo sedentário, a apocinina não modificou a razão capilar/fibra do grupo AS comparado ao CS. Por outro lado, a associação da apocinina ao TFII inibiu totalmente o aumento da razão capilar/fibra induzida pelo TFII, sendo esta razão significativamente maior no grupo CT comparado ao AT.

FIGURA 20 - Razão capilar/fibra dos músculos sóleo (A) e EDL (B), dos grupos controle sedentário, controle treinado, apocinina sedentário e apocinina treinado. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Turkey, onde: * $p < 0,05$ vs. CS e AS; + $p < 0,05$ vs. AT.

5.6 Função Contrátil *ex vivo*

A seguir são apresentados os resultados da função contrátil *ex vivo* dos músculos sóleo e EDL, avaliada pela: a) curva força x frequência (FxF), resposta da força isométrica específica (F_{esp}) em função do aumento da frequência (Hz) de estimulação; e b) curva de fadiga, expressa pelo percentual (%) da força isométrica máxima específica ($F_{\text{máx esp.}}$) em função do tempo. Ambas foram calculadas usando a força específica (força corrigida pela AST do músculo; em g/mm^2).

5.6.1 Curva força x frequência

Sóleo: o TFII teve uma tendência (N.S.) em aumentar ($\sim 16\%$) a F_{esp} nas maiores frequências (50, 80, 100 e 150 Hz) da curva FxF do grupo CT comparado ao do CS (FIGURA 21A). Nos grupos sedentários, a apocinina não modificou o comportamento da curva FxF do grupo AS comparado ao CS. A apocinina associada ao TFII não modificou a resposta da curva FxF, sendo a resposta do grupo AT semelhante aos grupos AS e CS. Por outro lado, a

apocinina associada ao TFII inibiu totalmente a resposta $F_{\text{esp.}}$ nas maiores frequências (50, 80, 100 e 150 Hz) da curva FxF do CT, onde esta foi significativamente menor ($\sim -35\%$) no grupo AT comparado ao grupo CT (FIGURA 21A).

FIGURA 21 - Curva da força específica em função da frequência de estimulação elétrica (força x frequência) dos músculos isolados sóleo (A) e EDL (B), avaliados ex vivo (banho de órgãos), dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). Dados apresentados como média pela ANOVA de dois fatores, com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Turkey, onde: * $p < 0,05$ vs. AT.

EDL: o TFII teve uma tendência (N.S.) em aumentar ($\sim 20\%$) a força específica nas maiores frequências (50, 80, 100 e 150 Hz) da curva FxF no grupo CT, comparado ao grupo CS (FIGURA 21B). A apocinina não modificou o comportamento das curvas FxF dos grupos AS e AT comparado ao do CS. Portanto estes resultados mostram que tanto a apocinina quanto o TFII isoladamente, e a apocinina associada ao TFII, não modificaram a resposta da curva FxF em relação ao grupo controle (CS) no músculo EDL (FIGURA 21B).

5.6.2 Curva de Fadiga muscular

A FIGURA 22 demonstra os resultados da curva de fadiga dos músculos sóleo e EDL. Os resultados mostram que não houve diferença na resposta da curva de fadiga entre

todos os grupos estudados, evidenciado pela diminuição do % $F_{\text{máx esp.}}$ em ambos os músculos sóleo (FIGURA 22A) e EDL (FIGURA 22B). Assim, estes resultados mostram que tanto a apocinina quanto o TFII isoladamente, e a apocinina associada ao TFII, não modificaram a resposta da curva de fadiga no sóleo e EDL.

FIGURA 22 - Curva do percentual da força máxima (% $F_{\text{máx}}$) em função do tempo dos músculos isolados sóleo (A) e EDL (B), avaliados ex vivo (banho de órgãos), dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). Dados apresentados como média pela ANOVA de dois fatores com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Turkey.

5.7 Área de Secção Transversa Muscular Esquelética

A FIGURA 23 demonstra os resultados da área de secção transversa (AST) dos músculos sóleo e EDL.

Os resultados mostram que não houve diferença na AST entre todos os grupos estudados, em ambos os músculos sóleo (FIGURA 23A) e EDL (FIGURA 23B). Assim, estes resultados mostram que tanto a apocinina quanto o TFII isoladamente, e a apocinina associada ao TFII, não modificaram a AST no sóleo e EDL. Apenas no músculo EDL houve uma tendência ao aumento (+10% N.S.) no grupo CT e uma redução (-6% N.S.) no grupo AT comparados ao CS.

FIGURA 23 - Área de secção transversa (AST) dos músculos sóleo (A) e EDL (B), dos grupos controle sedentário, controle treinado, apocinina sedentário e apocinina treinado. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Turkey.

5.8 Distribuição Percentual dos Tipos de Fibras Musculares

As FIGURAS 24 e 25 representam a distribuição percentual (%) dos diferentes tipos de fibras do sóleo (FIGURA 24) e EDL (FIGURA 25), por imagens de cortes histológicos transversais corados para miosina ATPase.

A FIGURA 26 demonstra os resultados da distribuição percentual dos tipos de fibras dos músculos sóleo e EDL.

Sóleo: os resultados mostram que não houve diferença na distribuição % das fibras tipo I, tipo IIA e intermediárias entre todos os grupos estudados (FIGURA 26A). Assim, estes resultados mostram que tanto a apocinina quanto o TFII isoladamente, e a apocinina associada ao TFII, não modificaram a distribuição % dos tipos de fibras no músculo sóleo.

FIGURA 24 - Imagens representativas de cortes histológicos dos músculos sóleo, coradas para miosina ATPase em pH 10.3, e adquiridas em objetiva 20X, dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). As fibras do tipo I são as mais claras, as do tipo IIA marcadas em preto e as intermediárias são acinzentadas.

FIGURA 25 - Imagens representativas de cortes histológicos dos músculos EDL coradas para miosina ATPase, em pH 10.3 e adquiridas em objetiva 20X, dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). As fibras do tipo I são as mais claras (brancas), as do tipo IIA marcadas em preto, IIX cinza mais escuro e IIB cinza mais claro, para cada foto.

EDL: diferentemente do músculo sóleo, o TFII alterou significativamente a distribuição percentual dos tipos de fibras no EDL. O TFII aumentou significativamente as fibras do tipo IIA (+17%) e diminuiu significativamente as fibras IIB (-21%) no grupo CT comparado ao grupo CS (FIGURA 26B). No grupo sedentário, a apocinina não modificou a distribuição percentual dos tipos de fibras do grupo AS comparado com CS. Por outro lado, a apocinina associada ao TFII evitou as alterações significativas na distribuição percentual das fibras IIA e IIB induzidas pelo treinamento. No entanto, não houve diferenças significativas entre os grupos no percentual das fibras do tipo I e IIX no músculo EDL (FIGURA 25B).

FIGURA 26 - Distribuição percentual dos tipos de fibras nos músculos sóleo (A) e EDL (B), dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, analisados pela ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Turkey, , onde: # $p < 0,05$ vs. CS para os tipos de fibra IIA e IIB.

5.9 Atividade da NADPH Oxidase

As atividades da enzima NADPH oxidase medida das frações de membranas dos músculos sóleo e EDL são demonstradas na FIGURA 27. Pode-se observar que o

comportamento da resposta da NADPH oxidase apresentou padrão distinto para os dois músculos estudados.

Sóleo: não houve diferença nas respostas da atividade NADPH oxidase entre todos os grupos estudados (FIGURA 27A). Assim, estes resultados mostram que tanto a apocinina quanto o TFII isoladamente, e a apocinina associada ao TFII não modificaram a atividade da NADPH oxidase no sóleo.

EDL: o TFII aumentou significativamente (+141%) a atividade da NADPH oxidase no grupo CT comparado ao grupo CS (FIGURA 27B). No grupo sedentário, a apocinina não modificou a atividade da NADPH oxidase do grupo AS comparado ao CS. Por outro lado, a apocinina associada ao TFII foi capaz de inibir totalmente o aumento da atividade da NADPH oxidase induzido pelo TFII no EDL, sendo o valor do grupo AT significativamente menor do que do grupo CT e semelhante ao do grupo CS.

FIGURA 27 - Atividade enzimática da NADPH oxidase nos músculos sóleo, (A) e EDL (B), dos grupos controle sedentário, controle treinado, apocinina sedentário e apocinina treinado. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Turkey, onde: * $p < 0,05$ vs. CS e AT.

5.10 Defesa Antioxidante Muscular

A seguir serão apresentados os resultados da defesa antioxidante, por meio das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), determinadas a partir dos homogenatos dos músculos sóleo e EDL.

5.10.1 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase

Sóleo: o TFII aumentou significativamente a atividade da SOD no grupo CT (+47%) comparado ao grupo CS (FIGURA 28A). Nos grupos sedentários, a apocinina não modificou a atividade da SOD do grupo AS comparado ao CS. Por outro lado, a apocinina associada ao TFII inibiu o aumento da atividade da SOD induzido pelo treinamento, onde a atividade da SOD foi semelhante entre os grupos AT, AS e CS.

EDL: o TFII aumentou significativamente a atividade da SOD no grupo CT (+36%) comparado ao grupo CS (FIGURA 28B). Nos grupos sedentários, a apocinina não modificou a atividade da SOD do grupo AS comparado ao CS. Por outro lado, a apocinina associada ao TFII inibiu o aumento da SOD induzido pelo treinamento, onde a atividade da SOD foi semelhante entre os grupos AT, AS e CS.

Estes resultados demonstram que o padrão de resposta da atividade da SOD foi semelhante entre os músculos sóleo e EDL.

5.10.2 Atividade da Enzima Catalase

Diferentemente do que se observou na resposta da atividade da SOD, demonstrada anteriormente, a resposta da atividade da CAT ao TFII apresentou comportamentos opostos entre os músculos sóleo e EDL.

Sóleo: o TFII diminuiu significativamente (-38%) a atividade da CAT em comparação ao grupo CS (FIGURA 28C). No grupo sedentário, a apocinina não modificou a atividade da CAT do grupo AS comparado ao CS. Por outro lado, a apocinina associada ao TFII inibiu parcialmente a redução da atividade da CAT induzida pelo treinamento, sendo os valores do grupo AT de redução de -22% (N.S.) contra -38% ($p < 0,05$) do CT comparados ao CS.

EDL: diferentemente do músculo sóleo, o TFII aumentou significativamente (+88%) a atividade da CAT em comparação ao grupo CS (FIGURA 28D). No grupo sedentário, a apocinina não modificou a atividade da CAT do grupo AS comparado ao CS. No entanto, a apocinina associada ao TFII inibiu o aumento da atividade da CAT induzido pelo treinamento, onde os valores do grupo AT foram semelhantes aos dos grupos AS e CS.

FIGURA 28 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no músculo sóleo, (A) e (C) respectivamente, e no músculo EDL (B) e (D), respectivamente, dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), apocinina sedentário (AS) e apocinina treinado (AT). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Turkey, onde: * $p < 0,05$ vs. CS; # $p < 0,05$ vs. AS.

5.11 Estado Redox e Estresse Oxidativo Muscular

A seguir, serão demonstrados os resultados do estado redox e de índices de estresse oxidativo de homogenatos dos músculos sóleo e EDL.

5.11.1 Razão GSH:GSSG

Inicialmente, para a análise do estado redox muscular, avaliamos a razão entre a glutathiona reduzida e a glutathiona oxidada (GSH:GSSG).

Sóleo: o TFII aumentou significativamente (+ 52%) a razão GSH:GSSG no grupo CT comparado ao grupo AS (FIGURA 29A). No grupo sedentário, a apocinina não modificou a razão GSH:GSSG do grupo AS comparado ao CS. Por outro lado, a apocinina associada ao TFII inibiu totalmente o aumento da razão GSH:GSSG induzido pelo treinamento, sendo os valores de AT, AS e CS semelhantes entre si.

EDL: os resultados mostram que tanto a apocinina quanto o TFII isoladamente, e a apocinina associada ao TFII não modificaram a resposta da razão GSH:GSSG, quando comparados ao grupo CS (FIGURA 29B).

5.10.2 Hidroperóxidos Lipídicos

Em seguida, para análise do estresse oxidativo, avaliamos a lesão oxidativa, por meio da determinação das concentrações de hidroperóxidos lipídicos.

Os resultados mostram que tanto a apocinina quanto o TFII isoladamente, e a apocinina associada ao TFII, não modificaram as concentrações de hidroperóxidos lipídicos, quando comparados ao grupo CS, em ambos os músculos sóleo e EDL (FIGURA 29C e 29D).

5.10.3 Proteínas Carboniladas

Posteriormente, para aprofundar a análise do estresse oxidativo, avaliamos outro marcador de lesão oxidativa, por meio da determinação de proteínas carboniladas (expressa pelo percentual em relação ao grupo controle).

Os resultados mostram que tanto a apocinina quanto o TFII isoladamente, e a apocinina associada ao TFII também não modificaram o percentual de proteínas carboniladas, quando comparados ao grupo CS, em ambos os músculos sóleo e EDL (FIGURA 29E e 29F).

FIGURA 29 - Razão glutatona reduzida:oxidada (GSH:GSSG) nos músculos sóleo (A) e EDL (B), concentração de hidroperóxidos lipídicos no músculo sóleo (C) e EDL (D) e níveis de proteínas carboniladas no músculo sóleo (E) e EDL (F), dos grupos controle sedentário, controle treinado, apocinina sedentário e apocinina treinado. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisados pela ANOVA de dois fatores, seguida de *post hoc* de Turkey, onde: * $p < 0,05$ vs. CS; # $p < 0,05$ vs. CT.

QUADRO 3 - Resumos dos principais resultados

Características morfofuncionais						
Variáveis	Efeito do TFII (vs. CS)		Efeito da APO (vs. CS)		Efeito do TFII+APO (vs. CT)	
ΔMC	↓		↔		↓†	
MMS/MC	↔		↔		↔	
MME/MC	↔		↔		↑	
Tolerância ao ex.	↑		↔		↑	
Potência aeróbica	↑		↔		↑	
Adaptações musculoesqueléticas						
Variáveis	Sóleo			EDL		
	Efeito do TFII (vs. CS)	Efeito da APO (vs. CS)	Efeito do TFII+APO (vs. CT)	Efeito do TFII (vs. CS)	Efeito da APO (vs. CS)	Efeito do TFII+APO (vs. CT)
Capilarização	↑	↔	↑†	↑	↔	↑†
Curva FxF	↔	↔	↓	↔	↔	↔
Curva de fadiga	↔	↔	↔	↔	↔	↔
AST	↔	↔	↔	↔	↔	↔
% Fibras tipo I	↔	↔	↔	↔	↔	↔
% Fibras tipo IIA	↔	↔	↔	↑	↔	↑†
% Fibras tipo intermediária	↔	↔	↔			
% Fibras tipo IIB				↓	↔	↓†
% Fibras tipo IIX				↔	↔	↔
Ativ. NADPH oxidase	↔	↔	↔	↑	↔	↑†
Ativ. SOD	↑	↔	↑†	↑	↔	↑†
Ativ. CAT	↓	↔	↓†	↑	↔	↑†
Razão GSH:GSSG	↑	↔	↑†	↔	↔	↔
Peroxidação Lipídica	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Proteínas carboniladas	↔	↔	↔	↔	↔	↔
↑ aumentou ↔ não alterou ↓ reduziu ↑† inibiu o aumento ↓† inibiu a redução						

6. DISCUSSÃO

Os resultados que foram apresentados acima são pioneiros em mostrar a participação da NADPH oxidase, via inibição por apocinina, em adaptações do músculo esquelético de ratos induzidas pelo TFII numa pesquisa *in vivo*.

Esses resultados divergiram quanto aos tipos de músculos oxidativo e glicolítico, aqui representados pelo sóleo e EDL respectivamente. Foi observado que a participação da NADPH oxidase nas respostas adaptativas ao TFII, no músculo EDL, foi determinante para que ocorresse: a capilarização, as mudanças de tipos de fibras e a melhora das atividades enzimáticas da SOD e CAT. No entanto, no músculo sóleo, a participação da NADPH oxidase não foi determinante nas respostas induzidas pelo TFII, pois não houve aumento da atividade desta enzima em função do treinamento nem do tratamento com apocinina. Porém, no músculo sóleo a apocinina teve um efeito antioxidante nas respostas de atividade da SOD e razão GSH:GSSG.

Pela literatura e pelos resultados apresentados, sabe-se que a apocinina tende a interferir no estado redox de muitos tipos de células, seja diretamente ou indiretamente. Mas ela só o fez neste estudo onde o foco foi o músculo esquelético, em associação ao exercício. É conhecido que a apocinina para agir como inibidora da NADPH oxidase, precisa ter a disposição H_2O_2 e tem relação com a atividade da MPO. É sabe-se que o exercício é um estímulo para maior produção de H_2O_2 , e há registros de que a atividade da MPO aumenta pós sessões de exercícios intensos. Isso justifica o porque de a apocinina só ter efeito no ME quando associada ao TFII, que tem sessões de exercício aeróbico intenso, característico de aumentar mais as concentrações de EROs que outros tipos de treinos (MOROZOV et al., 2006; POWERS; JACKSON, 2008)

A seguir, os comentários dos resultados serão divididos como nos subtítulos dos resultados.

6.1 Massa Corporal

Os resultados do ΔMC mostraram que TFII foi eficiente em manter o controle de peso dos animais, uma vez que o mesmo impediu o aumento da MC que é natural do período

de maturação em que se encontram. O controle de peso é importante para prevenção de diversas doenças como obesidade e diabetes, e o treinamento físico é importante neste ponto. O tratamento com a apocinina não teve efeito sobre o ΔMC . Apenas uma tendência a impedir o controle do peso quando associada ao TFII.

6.2 Massa Muscular

A massa muscular é uma variável importante na manutenção da saúde. Doenças sistêmicas e de caráter inflamatório costumam interferir na massa muscular esquelética. A perda elevada de massa muscular pode acarretar em intolerância ao exercício que em situações patológicas, podem ser cruciais para a sobrevivência (BECHARA, 2012). Em situações fisiológicas, o ganho de massa muscular tem uma associação à hipertrofia e melhora da função muscular (MAU-MOELLER et al., 2014). Mas exercícios aeróbicos nem sempre proporcionam o aumento da massa muscular (AURORA et al., 2014).

No presente estudo, o TFII não foi capaz de promover mudanças significativas nas massas musculares do sóleo e do EDL. Estes resultados estão de acordo com outros relatos da literatura, onde ratos com características de idade e raça semelhantes, que o treinamento aeróbico não aumentava a massa muscular do sóleo e do plantar (BECHARA, 2012). O EDL também não tem sempre sucesso no aumento da massa com exercícios aeróbicos. Ratos que utilizaram a roda de corrida no seu protocolo de treinamento também não tiveram aumento da massa do EDL (AURORA et al., 2014).

O tratamento com apocinina isoladamente também não teve efeito sobre a massa muscular. Por outro lado, a apocinina associada ao TFII, aumentou a massa do sóleo em relação ao grupo sedentário tratado com apocinina (AS) e do EDL em relação ao CS. Isto pode estar associado a um efeito da apocinina pelas calpastatinas, que são proteínas envolvidas na regulação de proteínas proteolíticas via efeitos inibitórios nas calpaína-1 e caspase-3 em músculos oxidativos (MCCLUNG et al., 2009). Isso porque quando associado ao treinamento físico, que é característico de favorecer um melhor balanceamento entre vias de síntese e degradação de proteínas tendendo para a síntese (ALVES, 2014), este efeito inibidor de proteólise pela apocinina poderia ser reforçado.

6.3 Tolerância ao Exercício

A tolerância ao exercício é uma capacidade física de suma importância para a qualidade de vida do ser humano. Além disso, tem sido amplamente relatado que em condições patológicas (ex. pacientes com câncer e insuficiência cardíaca), a perda de massa muscular leva a prejuízo da função muscular, fator envolvido na intolerância ao exercício e, consequentemente, diminuição da sobrevida (ALVES, 2014).

Nos resultados apresentados, o protocolo de TFII utilizado foi eficaz em aumentar a tolerância ao exercício. Por sua vez, a apocinina isoladamente ou associada ao TFII não modificou a resposta de diminuição da tolerância nos ratos sedentários nem a resposta de aumento da tolerância nos ratos treinados. Interessantemente, apesar das adaptações ao TFII observadas nos músculos sóleo e EDL dos ratos tratados com apocinina, estas não foram suficientes para melhorar a tolerância ao exercício nestes animais.

6.4 Potência Aeróbica

A potência aeróbica é medida pelo consumo máximo de oxigênio por kilo por minuto ($\text{VO}_{2\text{máx}}$). O consumo maior depende principalmente de melhor eficiência dos sistemas de transportes e distribuição de oxigênio. O treinamento físico aumenta o consumo de oxigênio. E o TFII tem sido apontado por ser mais eficiente nisto que outros tipos de treinamento (WISLOFF; ELLINGSEN; KEMI, 2009).

Os animais utilizados se encontravam numa fase de maturação em que o aumento de peso era normal. Por isso, o consumo de oxigênio que é corrigido pelo peso, diminuiu nos grupos sedentários. O TFII preveniu a queda do $\text{VO}_{2\text{máx}}$ de todos os animais treinados. Porém, a apocinina não alterou o $\text{VO}_{2\text{máx}}$ e também não interferiu na melhora induzida pelo TFII, apesar de a mesma ter impedido o aumento da razão capilar por fibra. Mas como a apocinina foi administrada in vivo, outros órgãos também podem estar sendo modulados, como por exemplo uma melhora da contratilidade e disponibilidade de cálcio do coração mostrados por Gonzalez (2014).

6.5 Capilarização

Como esperado, o TFII aumentou a capilarização tanto no músculo sóleo como no EDL. Além disso, a apocinina isolada não alterou a razão capilar/fibra destes músculos. No entanto, a apocinina associada ao TFII inibiu parcialmente a capilarização no músculo sóleo, e totalmente no músculo EDL. Interessantemente, no músculo sóleo, a NADPH oxidase não aumentou em ambos os grupos CT e AT. No entanto, é importante considerar que ao se tratar de capilarização, o aparecimento de novos capilares, angiogênese, depende da sinalização do tecido em questão que no caso é o vaso. Sendo assim, os resultados da razão capilar/fibra apresentados, propõem que a angiogênese esteja sendo sinalizada pela NADPH oxidase.

6.6 Função muscular

A função muscular depende muito do estado redox do músculo. É conhecido que o treinamento físico melhora a força muscular. Força essa que depende da interação e organização das proteínas contráteis, que são extremamente sensíveis a variação das concentrações de EROs. O treinamento físico aumenta a defesa antioxidante o que permite maior equilíbrio redox e melhora da função muscular (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008; JI, 2008; SACHDEV; DAVIES, 2008; JACKSON, 2011)

No entanto o TFII não aumentou a força muscular nem no sóleo e nem no EDL. Houve apenas tendências ao aumento dos valores da força nas suas curvas de FxF. Apesar de se esperar uma melhora da função, por um quadro de estado redox equilibrado, o exercício também não provocou mudanças na função dos músculos EDL e tibial (AURORA, 2014)

Porém, no músculo sóleo, a apocinina associada ao TFII fez os valores da força na FxF serem significativamente menor que os da curva FxF do grupo CT, especialmente nas frequências maiores (50, 80, 100 e 150Hz). Isto se justifica pelo fato de que em intensidades maiores a produção de oxidantes é maior (POWERS; JACKSON, 2008), e a apocinina associada ao TFII já tinha um ambiente mais oxidado que no grupo CT mostrado pela razão GSH:GSSG.

Curiosamente, esperava-se que a fadiga muscular fosse menor no grupo CT. No entanto, as porcentagens da $F_{máx}$ final das curvas de fadiga foram semelhantes entre todos os grupos e nos músculos sóleo e EDL. Há de se considerar que a análise com o músculo isolado

no banho de órgãos tira o músculo de suas reais condições no organismo, e coloca na cuba em igual condições para todos os grupos. A disponibilidade de oxigênio é um exemplo disso. Talvez em situações mais drásticas como músculos com atrofia ou até disfunção mitocondrial que interferiria na disponibilidade de energia para a contração, seja possível ver diferenças.

6.7 Área de Secção Transversa Muscular Esquelética

A melhora da função muscular está relacionada ao aumento da AST(MAU-MOELLER et al., 2014). E tanto no sóleo como no EDL, não houve aumento da AST apesar das diferenças na MMS e MME. Apenas no músculo EDL houve uma tendência ao aumento da AST e uma tendência do grupo AT em diminuir esta resposta. Estes resultados mostraram que nem o TFII e nem a apocinina interferiram na hipertrofia em resposta ao treinamento físico no sóleo e EDL, mostrando que o aumento da AST parece não ter influência da NADPH oxidase.

6.8 Distribuição dos Tipos de Fibras

O TFII não mudou a distribuição dos tipos de fibras no músculo sóleo. Luginbuhl, Dudley, Staron, (1984) mostraram mudanças em tipos de fibras induzidos por TFII comparando os diferentes tipos de músculos: oxidativo (sóleo), glicolítico (plantar) e misto. E os mesmos também não encontraram mudanças significativas no músculo oxidativo (sóleo). Sabemos que o treinamento aeróbico intenso aumenta as características oxidativas dos músculos e isto inclui mudanças de tipos de fibras para os tipos mais oxidativos (BOGDANIS, 2012). E é bem possível que no sóleo, por ser um músculo bastante oxidativo, essas mudanças nem sempre sejam suficientes para ser significante.

No entanto já foram demonstradas mudanças para o aumento de tipo IIA, e diminuição do tipo IIB em músculos de característica glicolítica (LUGINBUHL; DUDLEY; STARON, 1984), que corroboram com os resultados do EDL apresentados. Num outro estudo com pacientes com doença pulmonar crônica obstrutiva, onde é característico a perda de

fibras mais oxidativas, também demonstrou que o treinamento aeróbico intenso foi capaz de reverter esta característica em músculos glicolíticos (VOGIATZIS et al., 2005).

Está sendo sugerido que os superóxidos estejam envolvidos na sinalização celular associada às mudanças de tipos de fibras induzidas pelo treinamento físico. Desta forma, no presente estudo, buscou-se com o tratamento com apocinina, inibir a produção de superóxido pela NADPH oxidase e, conseqüentemente, atenuar a sinalização celular para estas mudanças nos tipos de fibras. Entretanto, observamos que o TFII e a apocinina, isoladamente ou em associação, não modificaram a atividade da NADPH oxidase no sóleo. Assim, estes resultados sugerem que isto pode ser um fator envolvido na não ocorrência de modificação do percentual de distribuição dos tipos de fibras.

Por outro lado, no músculo EDL, o tratamento com apocinina associado ao TFII inibiu o aumento da atividade da NADPH oxidase induzido pelo treinamento. Além disso, as mudanças nos tipos de fibras induzidas pelo TFII deixaram de ser significativas em relação ao grupo controle sedentário. Estes resultados sugerem a participação da NADPH oxidase, ainda que parcial, para que ocorram as resposta adaptativa de mudanças de tipos de fibras em direção as fibras mais resistentes a fadiga (IIA).

6.9 Atividade da NADPH Oxidase

A atividade da NADPH oxidase, importante complexo enzimático produtor de superóxido, não foi alterada pelo TFII e nem pela apocinina no músculo sóleo. Isso se justifica pela complexidade dos sistema de pro e oxidantes mais os antioxidantes dentro de uma célula. Num outro estudo com o músculo diafragma, que é um músculo de características oxidativas, a atividade também não foi alterada em função de ventilações espontâneas (MCCLUNG et al., 2009).

A atuação da apocinina nos diferentes tipos de células também é complexa, podendo ter função até de oxidante e antioxidante (VEJRAZKA; MICEK; STIPEK, 2005; STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008; PETRONIO et al., 2013). Como já citado na revisão da literatura, apocinina pode induzir estresse oxidativo em alguns tipos de células, sendo o seu efeito inibidor na atividade da enzima NADPH oxidase reforçado quanto maior for esta atividade. Além disso, a apocinina para agir como inibidor desta enzima precisa se oxidar

com o H_2O_2 a fim de formar o dímero que vai inibir a função da NADPH oxidase que é formar o superóxido (VEJRAZKA; MICEK; STIPEK, 2005).

Talvez exatamente por precisar do H_2O_2 para agir como inibidor, que todos os resultados que tiveram interferência da apocinina em algum dado foi quando ela foi associada a TFII. Isto porque, por o exercício físico aumentar a produção de EROs, favoreceria a ação da apocinina como agente inibidor. Além disso, o músculo oxidativo tem uma defesa antioxidante mais desenvolvida que as do músculo glicolítico e consegue equilibrar melhor o estado redox do músculo durante o exercício (POWERS; JACKSON, 2008). Portanto talvez não tenha tanto H_2O_2 a disposição para que a apocinina possa se oxidar e agir como inibidora.

Portanto, se o sóleo não teve atividade aumentada na NADPH oxidase pelo treinamento, provavelmente ela agiu como antioxidante, pois os resultados da razão GSH:GSSG que mostraram ambiente reduzido no CT e em AT essa resposta foi inibida puxando para o lado mais oxidado da balança do estado redox. Provavelmente a sinalização redox para melhora da defesa antioxidante (JI, 2008) pode ter sido inibida por um antioxidante. De mais a mais, os resultados de CAT também corroboraram com esta teoria. O TFII diminuiu a atividade da CAT e a apocinina junto com TFII inibiram este efeito, mostrando que a apocinina pode ter causado um aumento de ROS, devido a piora da defesa antioxidante, que desencadeou num aumento de concentrações de H_2O_2 , tornando a participação da CAT mais efetiva, uma vez que ela pode ter sido menos ativada no TFII por outras enzimas mais sensíveis ao H_2O_2 em concentrações mais baixas estarem ativadas como: a GPx e as peroredoxinas (POWERS; JACKSON, 2008; SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013).

No músculo EDL, a atividade da NADPH oxidase aumentou com o TFII. Por outro lado, o tratamento com a apocinina isoladamente não alterou a atividade desta enzima, no entanto, a apocinina associada ao TFII inibiu aumento desta atividade induzido pelo treinamento. Estes resultados sugerem que, diferentemente do músculo sóleo (oxidativo), o músculo EDL (glicolítico) está mais sujeito a um maior estresse oxidativo durante o exercício, por ter um sistema de defesa antioxidante menos desenvolvido. Interessantemente, a produção aumentada de ROS induzidas pelo exercício não foi suficiente para causar lesões oxidativas, evidenciado pela não alteração de peróxidos lipídeos e proteínas carboniladas. Contudo, é possível que no EDL ocorra uma maior produção de superóxido durante o exercício, produzido por diferentes fontes como a NADPH oxidase, mitocôndrias e xantina oxidase, e levar a uma maior concentração de peróxido de hidrogênio neste tecido. Finalmente, um

maior nível de peróxido de hidrogênio aumentaria a oxidação da apocinina e, consequentemente, o seu efeito inibitório.

6.10 Defesa Antioxidante

Como o esperado, o TFII foi eficaz em induzir o aumento da atividade da SOD em 47% e 36% nos músculos sóleo e EDL respectivamente. É sabido que o aumento de superóxido durante o exercício é um importante estímulo para ativar a defesa antioxidante (JI, 2008). No entanto, no músculo sóleo, o aumento da atividade da SOD parece não estar associado com uma maior atividade da NADPH oxidase, uma vez que esta não aumentou com o TFII. Portanto, é possível que outras fontes, como a xantina oxidase, mitocôndria e outras, estejam envolvidas na maior produção do superóxido no músculo sóleo durante o exercício aeróbico intenso.

Por outro lado, no músculo EDL, a atividade da SOD teve uma relação com a atividade da NADPH oxidase, onde ambas as atividades enzimáticas aumentaram com o TFII e diminuíram em função da associação da apocinina ao TFII. Estes resultados sugerem que a atividade da NADPH oxidase é importante para o aumento da atividade da SOD induzida pelo TFII no músculo EDL.

Contudo, apesar do aumento semelhante da atividade da SOD induzida pelo treinamento nos músculos sóleo e EDL, estes resultados sugerem que a participação da NADPH oxidase na indução do aumento da SOD é músculo específica, sendo esta mais determinante no músculo EDL.

Com o intuito de ampliar a compreensão das adaptações do sistema de defesa antioxidante induzidas pelo treinamento físico, avaliamos também a atividade da enzima CAT nos músculos sóleo e EDL. Os resultados demonstraram que no sóleo a atividade da CAT apresentou um comportamento contrário ao do EDL.

Inicialmente, observamos que o TFII diminuiu a atividade da CAT, bem como que a apocinina associada ao TFII foi capaz de inibir este efeito no músculo sóleo. O fato de o TFII ter induzido a diminuição da atividade da CAT, no músculo sóleo, poderia ser explicado por a produção de H_2O_2 induzida pelo TFII não ser suficiente a fim de ativar a CAT. É sabido que a ativação da CAT ocorre em situações de elevadas concentrações de H_2O_2 . Além disso, a remoção de H_2O_2 por outras enzimas, como a GPx e as peroredoxinas, as quais têm mais

afinidades ao H_2O_2 em baixa concentração, podem estar atuando em função da melhor defesa antioxidante deste tipo de músculo (POWERS; JACKSON, 2008; SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013).

Há muito, tem sido encontrado na literatura contradições na resposta da atividade da CAT induzida pelo treinamento físico. Há relatos de treinamentos aeróbicos que não mudaram a atividade da CAT (BECHARA, 2012) e de treinamentos mais intensos que promoveram a diminuição da mesma (PINHO et al., 2006). Além disso, a atividade da CAT pode ser inibida pelo superóxido, o qual certamente tem sua produção aumentada em situação de exercício, e mais ainda em exercícios intensos e prolongados (KONO; FRIDOVICH, 1982; POWERS; JACKSON, 2008).

O efeito da apocinina associada ao TFII em inibir a diminuição da atividade da CAT no músculo sóleo, pode estar relacionada a uma maior produção de EROs induzida pelo exercício (POWERS; JACKSON, 2008), bem como a uma possível ação antioxidante que agiria diminuindo concentrações de superóxido, por isso a SOD diminuiu no AT, e aumentando concentrações de peróxido de hidrogênio. Além disso, a apocinina pode ter contribuído para o aumento da concentração de H_2O_2 e, conseqüentemente, favorecido a ativação da CAT sobre a ação das enzimas GPx e as perorredoxinas (POWERS; JACKSON, 2008; SAKELLARIOU; JACKSON; VASILAKI, 2013). Este possível efeito antioxidante da apocinina associado ao TFII também estaria prejudicando a resposta da melhora da defesa antioxidante e do estado redox no músculo sóleo aqui representados como: a atividade da SOD e a razão da GHS:GSSG (ambiente mais oxidado) diminuídas no grupo AT em relação a CT.

Já no músculo EDL, os resultados da atividade da CAT foram de acordo com os resultados da atividade da NADPH oxidase. Inicialmente, observamos que o TFII aumentou a atividade da CAT e da NADPH oxidase. Entretanto, a apocinina associada ao TFII inibiu a atividade das duas enzimas. Portanto, estes resultados que a maior produção de superóxido pela NADPH oxidase induzida pelo treinamento é um mecanismo importante para a ativar as enzimas antioxidante, SOD e CAT, no músculo EDL. Diferentemente, no músculo sóleo, pode-se especular o envolvimento de outras fontes de produção de superóxido durante o exercício aeróbico intenso.

6.11 Marcadores de Estresse Oxidativo

O estado redox celular tem sido expresso pela razão GSH:GSSG. O treinamento aeróbico é conhecido por aumentar a concentração de GSH no ME, e assim proporcionar um ambiente mais reduzido e protegido contra estresse oxidativo (SEN, 1999) (SEN, 1999). Além disso, tem sido demonstrado que o treinamento aeróbico aumenta a razão GSH:GSSG em músculos oxidativos de ratos (VESKOUKIS et al., 2008; BALCI; PEPE, 2012), bem como em músculos oxidativos e glicolíticos de camundongos (FERREIRA, J. C. et al., 2010).

No presente estudo, observamos que o TFII aumentou a razão GSH:GSSG somente no músculo sóleo, mas não no músculo EDL. Estes resultados caracterizam um ambiente celular mais reduzido no músculo sóleo.

Este ambiente mais reduzido no músculo sóleo induzido pelo treinamento físico parece ser devido a uma melhora na atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD, observada nos grupos treinados. Contudo, não podemos destacar a participação de outras enzimas antioxidantes, não avaliadas neste estudo, como a GPx e as peroxirredoxinas, que também podem ser moduladas e partir de outras fontes de EROS. Por outro lado, a apocinina associada ao TFII, inibiu o aumento da razão GSH:GSSG, tornando o ambiente mais oxidado no músculo sóleo, comparado ao grupo treinado. Interessantemente, o possível efeito antioxidante da apocinina (VEJRAZKA; MICEK; STIPEK, 2005) pode ter contribuído para inibir a melhora da defesa antioxidante e do estado redox celular induzido pelo treinamento físico.

No músculo EDL, não observamos alterações na razão GSH:GSSG induzidas pelo TFII ou apocinina, isoladamente. Por outro lado, a inibição da NADPH oxidase observada no grupo TFII associado à apocinina, pode ter diminuído a produção de superóxido e, consequentemente, ter sido um importante fator limitante da melhora da defesa antioxidante e do estado redox celular induzidos pelo treinamento físico.

No presente estudo, observamos que o TFII não modificou os marcadores de lesões oxidativas avaliados pelas concentrações de hidroperóxidos lipídicos e de proteínas carboniladas, tanto no sóleo como no EDL. Além disso, apesar da apocinina associada ao TFII ter evitado a melhora da defesa antioxidante induzida pelo TFII nos dois músculos, esta resposta não proporcionou aumento de lesão oxidativa nos ratos treinados. Cabe destacar que os ratos estudados eram saudáveis e em idade adulta jovem, isto é, sem complicações associadas. Desta forma, o protocolo de TFII foi eficaz em induzir a melhora da defesa

antioxidante e, portanto, contribuir para manter o baixo nível de lesão oxidativa nestes músculos.

Diante destes resultados, foi possível observar que a melhora na resposta da defesa antioxidante induzida pelo TFII aconteceu para os dois músculos (sóleo e EDL), e que a apocinina inibiu esta adaptação ao treinamento também nos dois músculos. Embora, possivelmente estes resultados possam ter ocorrido por ações diferentes da apocinina em cada um dos músculos, ou seja, uma ação antioxidante no sóleo e uma ação inibidora da NADPH oxidase no EDL.

7. CONCLUSÃO

A partir destes resultados, pode-se concluir que a NADPH oxidase é ativada em função do TFII no músculo EDL mas não no músculo sóleo. O tratamento com apocinina por sua vez não inibi a atividade da NADPH oxidase nos músculos sóleo e EDL de ratos sedentários. No entanto, a apocinina associada ao TFII inibe o aumento da atividade da NADPH oxidase no músculo EDL induzida por este tipo de treino, apesar de não alterar esta atividade no músculo sóleo. A ativação da NADPH oxidase por sua vez, parece estar envolvida nas adaptações músculo esqueléticas de capilarização, mudanças de tipos de fibras e defesa antioxidante (SOD e CAT) apenas no músculo EDL, sendo estas adaptações inibidas pelo tratamento com apocinina. Finalmente, no músculo sóleo, o TFII induz a melhora da capilarização e da defesa antioxidante (SOD), possivelmente sinalizada por outras vias de produção de EROs. No entanto, quando há o tratamento com a apocinina associado a este tipo de treino, estas adaptações não ocorrem, possivelmente por um efeito antioxidante desta.

Portanto, a NADPH oxidase parece participar de vias de sinalização redox de adaptações musculares esqueléticas induzidas pelo TFII apenas nos músculos de características glicolíticas. E assim, concluiu-se que músculos glicolíticos e oxidativos podem ter vias de sinalizações diferentes para estas adaptações.

Justamente pelas variações de intensidade e duração do exercício influenciarem o estado redox e também desencadearem adaptações diferentes no ME em função de treinamento físico, este estudo tem uma relevância em programas de treinamento de alto rendimento, uma vez que estes programas precisam cada vez mais de preparações individualizadas e específicas. Sendo assim, espera-se que no futuro, informações do estado redox muscular possam ser usadas para melhorar a especialização do treinamento físico de atletas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL GHOULEH, I.; KHOO, N. K.; KNAUS, U. G.; GRIENDLING, K. K.; TOUYZ, R. M.; THANNICKAL, V. J.; BARCHOWSKY, A.; NAUSEEF, W. M.; KELLEY, E. E.; BAUER, P. M.; DARLEY-USMAR, V.; SHIVA, S.; CIFUENTES-PAGANO, E.; FREEMAN, B. A.; GLADWIN, M. T.; PAGANO, P. J. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 7, p. 1271-1288, 2011.
- ALDIERI, E.; RIGANTI, C.; POLIMENI, M.; GAZZANO, E.; LUSSIANA, C.; CAMPIA, I.; GHIGO, D. Classical inhibitors of NOX NAD(P)H oxidases are not specific. **Curr Drug Metab**, v. 9, n. 8, p. 686-696, 2008.
- ALLEN, D. G.; LAMB, G. D.; WESTERBLAD, H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. **Physiol Rev**, v. 88, n. 1, p. 287-332, 2008.
- ALVES, C. R. R. Aerobic exercise training as therapy for cardiac and cancer cachexia. **Life sciences**, v., n., p. 1-6, 2014.
- AUGUST, O., v., n., p., 2006.
- AURORA, A.; GARG, K.; CORONA, B. T.; WALTERS, T. J. Physical rehabilitation improves muscle function following volumetric muscle loss injury. **BMC Sports Sci Med Rehabil**, v. 6, n. 1, p. 41, 2014.
- BALCI, S. S.; PEPE, H. Effects of gender, endurance training and acute exhaustive exercise on oxidative stress in the heart and skeletal muscle of the rat. **Chin J Physiol**, v. 55, n. 4, p. 236-244, 2012.
- BECHARA, L. R. G. **Contribuição do complexo enzimático NADPH oxidase na atrofia muscular de ratos infartados: influência do treinamento físico aeróbico**. Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. 146 p.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.
- BELCASTRO A. N.; ARTHUR G. D.; ALBISSER T. A.; AI, D. A. Heart, liver, and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 80, n. 4, p. 1331-1335, 1996.
- BOGDANIS, G. C. Effects of physical activity and inactivity on muscle fatigue. **Front Physiol**, v. 3, n., p. 142, 2012.
- BRUM, P. C.; BACURAU, A. V.; MEDEIROS, A.; FERREIRA, J. C.; VANZELLI, A. S.; NEGRAO, C. E. Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 9, p. 827-835, 2011.

CUNHA, T. F.; MOREIRA, J. B.; PAIXAO, N. A.; CAMPOS, J. C.; MONTEIRO, A. W.; BACURAU, A. V.; BUENO, C. R., JR.; FERREIRA, J. C.; BRUM, P. C. Aerobic exercise training upregulates skeletal muscle calpain and ubiquitin-proteasome systems in healthy mice. **J Appl Physiol** (1985), v. 112, n. 11, p. 1839-1846, 2012.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DWORAKOWSKI, R.; ANILKUMAR, N.; ZHANG, M.; SHAH, A. M. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. **Biochem Soc Trans**, v. 34, n. Pt 5, p. 960-964, 2006.

ENG, C. M.; SMALLWOOD, L. H.; RAINIERO, M. P.; LAHEY, M.; WARD, S. R.; LIEBER, R. L. Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb. **J Exp Biol**, v. 211, n. Pt 14, p. 2336-2345, 2008.

FERREIRA, J. C.; BACURAU, A. V.; BUENO, C. R., JR.; CUNHA, T. C.; TANAKA, L. Y.; JARDIM, M. A.; RAMIRES, P. R.; BRUM, P. C. Aerobic exercise training improves Ca²⁺ handling and redox status of skeletal muscle in mice. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 235, n. 4, p. 497-505, 2010.

FERREIRA, L. F.; REID, M. B. Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. **J Appl Physiol** (1985), v. 104, n. 3, p. 853-860, 2008.

FLECK, S. J. K., W. J. . **Designing resistance training programs**: Human Kinetics, 1997
GIBALA, M. J.; LITTLE, J. P.; VAN ESSEN, M.; WILKIN, G. P.; BURGOMASTER, K. A.; SAFDAR, A.; RAHA, S.; TARNOPOLSKY, M. A. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. **J Physiol**, v. 575, n. Pt 3, p. 901-911, 2006.

GORDON, A. M.; HOMSHER, E.; REGNIER, M. Regulation of contraction in striated muscle. **Physiol Rev**, v. 80, n. 2, p. 853-924, 2000.

HAYASHI, T.; JULIET, P. A.; KANO-HAYASHI, H.; TSUNEKAWA, T.; DINGQUNFANG, D.; SUMI, D.; MATSUI-HIRAI, H.; FUKATSU, A.; IGUCHI, A. NADPH oxidase inhibitor, apocynin, restores the impaired endothelial-dependent and -independent responses and scavenges superoxide anion in rats with type 2 diabetes complicated by NO dysfunction. **Diabetes Obes Metab**, v. 7, n. 4, p. 334-343, 2005.

HIDALGO, C.; SANCHEZ, G.; BARRIENTOS, G.; ARACENA-PARKS, P. A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S -glutathionylation. **J Biol Chem**, v. 281, n. 36, p. 26473-26482, 2006.

JACKSON, M. J. Control of reactive oxygen species production in contracting skeletal muscle. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 9, p. 2477-2486, 2011.

JANISZEWSKI, M.; SOUZA, H. P.; LIU, X.; PEDRO, M. A.; ZWEIER, J. L.; LAURINDO, F. R. Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. **Free Radic Biol Med**, v. 32, n. 5, p. 446-453, 2002.

Jl, L. L. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2, p. 142-152, 2008.

JONES, D. R., J.; HAAN A. (Ed.). **Book title**: Churchill Livingstone, 2004,
JUNQUEIRA, L. C. C., J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2008

KLENIEWSKA, P.; PIECHOTA, A.; SKIBSKA, B.; GORACA, A. The NADPH oxidase family and its inhibitors. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 60, n. 4, p. 277-294, 2012.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **J Biol Chem**, v. 257, n. 10, p. 5751-5754, 1982.

KUWAHARA, H.; HORIE, T.; ISHIKAWA, S.; TSUDA, C.; KAWAKAMI, S.; NODA, Y.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; TACHIBANA, T.; OKABE, M.; MELKI, J.; TAKANO, R.; TODA, T.; MORIKAWA, D.; NOJIRI, H.; KUROSAWA, H.; SHIRASAWA, T.; SHIMIZU, T. Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. **Free Radic Biol Med**, v. 48, n. 9, p. 1252-1262, 2010.

LAFEBER, F. P.; BEUKELMAN, C. J.; VAN DEN WORM, E.; VAN ROY, J. L.; VIANEN, M. E.; VAN ROON, J. A.; VAN DIJK, H.; BIJLSMA, J. W. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 38, n. 11, p. 1088-1093, 1999.

LAMB, G. D.; WESTERBLAD, H. Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 9, p. 2119-2127, 2011.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 3, p. 181-189, 2004.

LAURSEN, P. B. Training for intense exercise performance: high-intensity or high-volume training? **Scand J Med Sci Sports**, v. 20 Suppl 2, n., p. 1-10, 2010.

LIEBER, R. L. Skeletal Muscle Structure, Function, and Plasticity: The Physiological Basis of Rehabilitation. **Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins**, v., n., p., 2009.

LUGINBUHL, A. J.; DUDLEY, G. A.; STARON, R. S. Fiber type changes in rat skeletal muscle after intense interval training. **Histochemistry**, v. 81, n. 1, p. 55-58, 1984.

MARTYN, K. D.; FREDERICK, L. M.; VON LOEHNEYSSEN, K.; DINAUER, M. C.; KNAUS, U. G. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. **Cell Signal**, v. 18, n. 1, p. 69-82, 2006.

MAU-MOELLER, A.; BRUHN, S.; BADER, R.; BEHRENS, M. The Relationship between Lean Mass and Contractile Properties of the Quadriceps in Elderly and Young Adults. **Gerontology**, v., n., p., 2014.

MCARDLE, W. D. K., F. I.; KATCH, V. L. 6ª EDIÇÃO, GUANABARA KOOGAN, 2008. Fisiologia do Exercício. Energia, Nutrição e Desempenho Humano. **Guanabara Koogan**, v., n., p., 2008.

MCCLUNG, J. M.; VAN GAMMEREN, D.; WHIDDEN, M. A.; FALK, D. J.; KAVAZIS, A. N.; HUDSON, M. B.; GAYAN-RAMIREZ, G.; DECRAMER, M.; DERUISSEAU, K. C.; POWERS, S. K. Apocynin attenuates diaphragm oxidative stress and protease activation during prolonged mechanical ventilation. **Crit Care Med**, v. 37, n. 4, p. 1373-1379, 2009.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MICHAELSON, L. P.; SHI, G.; WARD, C. W.; RODNEY, G. G. Mitochondrial redox potential during contraction in single intact muscle fibers. **Muscle Nerve**, v. 42, n. 4, p. 522-529, 2010.

MOOPANAR, T. R.; ALLEN, D. G. Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca²⁺ sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37 degrees C. **J Physiol**, v. 564, n. Pt 1, p. 189-199, 2005.

MOROZOV, V. I.; TSYPLENKOV, P. V.; GOLBERG, N. D.; KALINSKI, M. I. The effects of high-intensity exercise on skeletal muscle neutrophil myeloperoxidase in untrained and trained rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 97, n. 6, p. 716-722, 2006.

NOUROOZ- ZADEH, J. T.-S. W., S. P. Measurement of Plasma Hydroperoxide Concentrations by the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay in Conjunction With Triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, v. 220, n., p. 403-409, 1994.

NYBO, L. S., E.; JAKOBSEN, M. D.; MOHR, M.; HORNSTRUP, T. SIMINSEN, L.; BULOW, J.; RANDERS, M. B.; NIELSEN, J. J.; AAGAARD, P.; KRUSTRUP, P. Hgh-intensity Training versus Traditional Exercise Interventions for Promoting Health. **American College of Sports Medicine**, v. 42, n. 10, p. 1951-1958, 2010.

OELZE, M.; KNORR, M.; SCHUHMACHER, S.; HEEREN, T.; OTTO, C.; SCHULZ, E.; REIFENBERG, K.; WENZEL, P.; MUNZEL, T.; DAIBER, A. Vascular dysfunction in streptozotocin-induced experimental diabetes strictly depends on insulin deficiency. **J Vasc Res**, v. 48, n. 4, p. 275-284, 2011.

PECHANOVA, O.; JENDEKOVA, L.; VRANKOVA, S. Effect of chronic apocynin treatment on nitric oxide and reactive oxygen species production in borderline and spontaneous hypertension. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 1, p. 116-122, 2009.

PETRONIO, M. S.; ZERAIK, M. L.; FONSECA, L. M.; XIMENES, V. F. Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2821-2839, 2013.

PETRY, A.; WEITNAUER, M.; GORLACH, A. Receptor activation of NADPH oxidases. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 4, p. 467-487, 2010.

PINHO, R. A.; ANDRADES, M. E.; OLIVEIRA, M. R.; PIROLA, A. C.; ZAGO, M. S.; SILVEIRA, P. C.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. **Cell Biol Int**, v. 30, n. 10, p. 848-853, 2006.

POHANKA, M. Role of oxidative stress in infectious diseases. A review. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 58, n. 6, p. 503-513, 2013.

POWERS, S. K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; JI, L. L.; MARTIN, D.; HERB, R. A.; DUDLEY, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 266, n. 2 Pt 2, p. R375-380, 1994.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1243-1276, 2008.

POWERS, S. K.; NELSON, W. B.; HUDSON, M. B. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 5, p. 942-950, 2011.

RABELO, L. A.; SOUZA, V. N.; FONSECA, L. J.; SAMPAIO, W. O. Redox unbalance: NADPH oxidase as therapeutic target in blood pressure control. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 5, p. 643-651, 684-693, 2010.

RAMIRES, P. R.; JI, L. L. Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, n. 2, p. H679-688, 2001.

SACHDEV, S.; DAVIES, K. J. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2, p. 215-223, 2008.

SAKELLARIOU, G. K.; JACKSON, M. J.; VASILAKI, A. Redefining the major contributors to superoxide production in contracting skeletal muscle. The role of NAD(P)H oxidases. **Free Radic Res**, v., n., p., 2013.

SAKELLARIOU, G. K.; VASILAKI, A.; PALOMERO, J.; KAYANI, A.; ZIBRIK, L.; MCARDLE, A.; JACKSON, M. J. Studies of mitochondrial and nonmitochondrial sources implicate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase(s) in the increased skeletal muscle superoxide generation that occurs during contractile activity. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 6, p. 603-621, 2013.

SCHRODER, K.; ZHANG, M.; BENKHOFF, S.; MIETH, A.; PLIQUETT, R.; KOSOWSKI, J.; KRUSE, C.; LUEDIKE, P.; MICHAELIS, U. R.; WEISSMANN, N.; DIMMELER, S.; SHAH, A. M.; BRANDES, R. P. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. **Circ Res**, v. 110, n. 9, p. 1217-1225, 2012.

SEENE, T.; KAASIK, P.; UMNOVA, M. Structural rearrangements in contractile apparatus and resulting skeletal muscle remodelling: effect of exercise training. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 49, n. 4, p. 410-423, 2009.

SEN, C. K. Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements. **Mol Cell Biochem**, v. 196, n. 1-2, p. 31-42, 1999.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: molecular aptitudes. **Mediators Inflamm**, v. 2008, n., p. 106507, 2008.

VAN DEN WORM, E. Investigations on apocynin , a potent NADPH Oxidase inhibitor. v., n., p., 2001.

VEJRAZKA, M.; MICEK, R.; STIPEK, S. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1722, n. 2, p. 143-147, 2005.

VESKOUKIS, A. S.; NIKOLAIDIS, M. G.; KYPAROS, A.; KOKKINOS, D.; NEPKA, C.; BARBANIS, S.; KOURETAS, D. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 33, n. 6, p. 1140-1154, 2008.

VOGIATZIS, I.; TERZIS, G.; NANAS, S.; STRATAKOS, G.; SIMOES, D. C.; GEORGIADOU, O.; ZAKYNTINOS, S.; ROUSSOS, C. Skeletal muscle adaptations to interval training in patients with advanced COPD. **Chest**, v. 128, n. 6, p. 3838-3845, 2005.

WEDE, I.; ALTINDAG, Z. Z.; WIDNER, B.; WACHTER, H.; FUCHS, D. Inhibition of xanthine oxidase by pterins. **Free Radic Res**, v. 29, n. 4, p. 331-338, 1998.

WESTERBLAD, H.; ALLEN, D. G. Emerging roles of ROS/RNS in muscle function and fatigue. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 9, p. 2487-2499, 2011.

WEYDERT, C. J.; CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nat Protoc**, v. 5, n. 1, p. 51-66, 2010.

WHITEHURST, M. High-Intensity Interval Training: An Alternative for Older Adults. **American Journal of Lifestyle Medicine**, v. 6, n. 5, p. 382-386, 2012.

WISLOFF, U.; ELLINGSEN, O.; KEMI, O. J. High-intensity interval training to maximize cardiac benefits of exercise training? **Exerc Sport Sci Rev**, v. 37, n. 3, p. 139-146, 2009.

ZUO, L.; NOGUEIRA, L.; HOGAN, M. C. Reactive oxygen species formation during tetanic contractions in single isolated *Xenopus* myofibers. **J Appl Physiol**, v. 111, n. 3, p. 898-904, 2011.