

GISLAINE DOS SANTOS SILVA

**EFEITO DE SESSÃO REPETIDA DE EXERCÍCIO EXCÊNTRICO
NA EXPRESSÃO DE GENES PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIOS
NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

GISLAINE DOS SANTOS SILVA

**EFEITO DE SESSÃO REPETIDA DE EXERCÍCIO EXCÊNTRICO
NA EXPRESSÃO DE GENES PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIOS
NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Prof^a Dr^a Elen Haruka Miyabara

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Silva, Gislaine dos Santos.

Efeito de sessão repetida de exercício excêntrico na expressão de genes pró e anti-inflamatórios no músculo esquelético/ Gislaine dos Santos Silva. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Plasticidade morfofuncional do músculo esquelético com ênfase em regeneração.

Versão do título para o inglês: Repeated session effect of eccentric exercise in expression of pro and anti-inflammatory genes in skeletal muscle.

1. Músculo esquelético 2. Citocinas inflamatórias 3. Exercício excêntrico 4. Efeito da carga repetida 5. Expressão gênica
I. Miyabara, Profa. Dra. Elen Haruka II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0159/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Gislaïne dos Santos Silva.

Título da Dissertação: Efeito de sessão repetida de exercício excêntrico na expressão de genes pró e anti-inflamatórios no músculo esquelético.

Orientadora: Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado,
em sessão pública realizada a 27/11/2015, considerou

(X) Aprovada **() Reprovada**

Examinador: Assinatura:
Nome: Ii-Sei Watanabe
Instituição: Universidade de São Paulo – USP/ICBIII

Examinador: Assinatura:
Nome: Renato Barroso da Silva
Instituição: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Presidente: Assinatura:
Nome: Elen Haruka Miyabara
Instituição: Universidade de São Paulo – USP/ICBIII



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 -e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.066/2011.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 044/13/CEUA, datado de 19.05.13 e por solicitação da Profa. Dra. **Elen Haruka Miyabara**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Gislaine dos Santos Silva** ao Projeto de Pesquisa "*Aspectos estruturais e moleculares da regeneração muscular esquelética*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 05 de julho de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

Dedico a Deus,

ao meu intercessor e salvador, Jesus Cristo,

a minha mãe e família,

e a mim mesma, com toda gratidão

pela presença e esforço

durante a elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem a benção Dele jamais faria nada em minha vida.

À orientação da Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara.

A minha mãe, afinal ela foi e continua sendo uma fonte de inspiração,
sempre me apoiando em tudo.

A minha família, a qual muitas vezes foi (e ainda é) um alicerce.

A minha madrinha (Miralda) e ao amigo Jaime, os quais me
ajudaram financeiramente quando mais precisei.

Aos poucos e bons amigos que estiveram (e estão) ao meu lado.

Àqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A mim mesma, por desenvolver e concluir a minha dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
pelo apoio financeiro.

RESUMO

Silva GS. Efeito de sessão repetida de exercício excêntrico na expressão de genes pró e anti-inflamatórios no músculo esquelético. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Diante da importância da integridade muscular para a manutenção da qualidade de vida e para a prática de atividade física, torna-se cada vez maior o interesse na investigação de estratégias capazes de maximizar a resposta regenerativa muscular. Neste contexto, o estudo do possível efeito “protetor” gerado por sessão repetida de exercício excêntrico na musculatura esquelética ainda é pouco explorado. As contrações excêntricas causam lesão muscular por meio do desarranjo dos filamentos dos sarcômeros, o que leva à ruptura do sarcolema, aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular com subsequente ativação de proteólise. Por outro lado, uma sessão repetida de exercício excêntrico acarreta na redução da lesão muscular com conseqüente atenuação da dor e da perda de força muscular. Esse fenômeno, uma espécie de mecanismo protetor, é conhecido como “efeito da carga repetida”. Visando contribuir para o melhor entendimento do efeito da carga repetida sobre a musculatura esquelética, em especial, a expressão de genes pró e anti-inflamatórios após o dano promovido pelo exercício excêntrico, camundongos selvagens foram submetidos a uma ou duas sessões de exercício excêntrico e os músculos sóleos foram avaliados após 24 horas e 3 dias. A análise histológica mostrou fibras musculares lesadas nos músculos sóleos de animais submetidos à 1ª sessão, com considerável atenuação no número de fibras musculares lesadas nos animais submetidos à 2ª sessão. Em geral, a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , iNOS e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10, YM1, Fizz-1 e Arginase-1) foi alta em 24 h após a 1ª sessão, e reduziu aos níveis do grupo controle em 24 h após a 2ª sessão de exercício excêntrico. Nossos resultados sugerem que o aumento da expressão gênica dessas citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido muscular antes da 2ª sessão pode ter contribuído para a atenuação da lesão muscular detectada em 24 h após a 2ª sessão de exercício excêntrico.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Citocinas inflamatórias. Exercício excêntrico. Efeito da carga repetida. Expressão gênica.

ABSTRACT

Silva GS. Repeated session effect of eccentric exercise in expression of pro and anti-inflammatory genes in skeletal muscle. [Masters thesis (Morphofunctional Science)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Considering that muscle integrity is crucial for maintenance of quality of life and for physical activity, there is an increasing interest in the investigation of strategies able to maximize the muscle regenerative process. In this context, the study of the possible protective effect generated by repeated eccentric exercise bout on skeletal muscle is still poorly explored. The eccentric contractions cause muscle injury through the disarray of sarcomere filaments, which leads to sarcolemma disruption, increase in the intracellular calcium concentration with subsequent activation of proteolysis. Moreover, one repeated eccentric exercise bout cause attenuation of muscle damage and consequent pain relief and loss of muscle strength. This phenomenon, a protective mechanism, is known as "repeated bout effect". In order to contribute to a better understanding of the repeated bout effect on skeletal muscle, in particular, the expression of pro and anti-inflammatory genes after injury caused by eccentric exercise, wild-type mice were subjected to one or two bouts of eccentric exercise and soleus muscles were evaluated after 24 hours or 3 days. Histological analysis showed damaged myofibers in soleus muscles from animals subjected to the 1st bout, with considerable attenuation in the number of injured myofibers from animals subjected to the 2nd bout. In general, the gene expression of pro-inflammatory (TNF- α , iNOS and IL-1 β) and anti-inflammatory (IL-10, YM1, Fizz-1 and Arginase-1) cytokines was high at 24h post the 1st bout, and reduced to the control group levels at 24 h after two bouts of eccentric exercise. Our results suggest that the increased gene expression of these pro and anti-inflammatory cytokines in muscle tissue before the 2nd bout might contribute to the attenuation of muscle injury detected in 24 h after the 2nd bout of eccentric exercise.

Keywords: Skeletal muscle. Inflammatory cytokines. Eccentric exercise. Repeated bout effect. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva força tetânica-comprimento do sarcômero registrada em fibras musculares isoladas de camundongos. Força tetânica máxima próxima a 2.4 μm de comprimento do sarcômero. Ilustração esquemática mostra sarcômero encurtado (<1.7 μm), comprimento ideal e estirado (>3.0 μm). Adaptado de Edman (2005).....18

Figura 2: Curva força-comprimento do músculo. Participação de elementos ativos (curva parabólica) e passivos (círculos fechados) na produção total de força muscular (círculos abertos). Adaptado de Enoka (2002).....18

Figura 3: Diagrama de quatro sarcômeros “vizinhos”. (A) Organização normal próxima ao comprimento ótimo. Arranjo estrutural dos filamentos contráteis (actina e miosina) e elásticos (titina e desmina), delimitados pelos discos Z. (B) Possível disposição organizacional após 30% de estiramento. Na região superior, metade de um sarcômero é superestendido (à direita) e o outro sarcômero vizinho tem o seu comprimento mantido. Abaixo, os dois sarcômeros vizinhos são estirados proporcionalmente. Adaptado de Allen (2001).....19

Figura 4: Indutores e propriedades funcionais de diferentes subpopulações de macrófagos. Polarização de macrófagos, secreção de citocinas e fatores de crescimento em resposta aos sinais derivados do microambiente. IFN- γ , LPS e TNF- α orquestram a polarização de macrófagos M1 em respostas antitumorais, enquanto IL-4 e IL-13, IC+TLR e agonista IL-1R, e IL-10 induzem macrófagos M2a (alergia e fagocitose), M2b (imunorregulação) e M2c (deposição de matriz extracelular e remodelamento tecidual), respectivamente. Abreviações: LPS, Lipopolissacarídeo; IC, Complexo imune; TLR, Receptor *Toll-like*; IL-1R, Receptor de IL-1; CD68, *cluster de diferenciação* 68; PTX3, Pentraxina longa 3, Adaptado de Mantovani et al. (2004).....25

Figura 5: Fotomicrografias representativas de seções transversais de músculos sóleos de camundongos jovens. (A) músculo sóleo controle; (B) músculo sóleo analisado em 24 h após uma sessão de exercício excêntrico; (C) músculo sóleo analisado em 24 h após duas sessões de exercício excêntrico; (D) músculo sóleo analisado em 3 dias após uma sessão de exercício excêntrico; (E) músculo sóleo analisado em 3 dias após duas sessões de exercício excêntrico. Barras 100 μm (fotomicrografias da 1ª coluna) e 50 μm (fotomicrografias da 2ª coluna). Coloração de HE. Os asteriscos indicam espaço intersticial.....36

Figura 6. Porcentagem da área de interstício de músculos sóleos analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=4), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=6) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=5). Média da área de secção transversal do músculo por grupo: $1,2 \times 10^6$, $1,1 \times 10^6$ e $1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$, respectivamente. * $p < 0,001$ versus controle; ^a $p < 0,001$ versus 1ª sessão - 24 h.....37

Figura 7. Porcentagem da área de interstício de músculos sóleos analisados 3 dias após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=4), barra preta (1ª sessão – 3 dias, n=3) e barra cinza (2ª sessão – 3 dias, n=3). Média da área de secção transversal do músculo por grupo: $1,2 \times 10^6$, $1,2 \times 10^6$ e $1,1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$, respectivamente. *p<0,05 versus controle; ^ap<0,001 versus 1ª sessão – 3 dias.....37

Figura 8: Fibras musculares lesadas marcadas com EBD, em vermelho (A-C); coloração de HE (D-F). Secções transversais de músculo sóleo controle (A e D); músculo sóleo analisado em 24 h após uma sessão de exercício excêntrico (B e E); músculo sóleo analisado em 24 h após duas sessões de exercício excêntrico (C e F). Barra 50 μm (fotomicrografias da 1ª e da 2ª coluna). As setas indicam fibras lesadas.....38

Figura 9: Porcentagem de fibras musculares lesadas de músculos sóleos analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=4), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=5) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=3). Média do total de fibras por músculo = 805. *p<0,01 versus controle; ^ap<0,01 versus 1ª sessão – 24h.....39

Figura 10. Expressão gênica de TNF- α em músculos sóleos controle ou analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=8), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=6) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=8). *p<0,05 versus controle; ^ap<0,05 versus 1ª sessão – 24 h.....39

Figura 11. Expressão gênica de iNOS em músculos sóleos controle ou analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=7), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=7) e barra cinza (2ª sessão – 24h, n=9). *p<0,01 versus controle; ^ap<0,01 versus 1ª sessão – 24 h.....40

Figura 12. Expressão gênica de IL-1 β em músculos sóleos controle ou analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=7), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=8) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=8). *p<0,05 versus controle; ^ap<0,05 versus 1ª sessão – 24 h.....40

Figura 13. Expressão gênica de MCP-1 em músculos sóleos controle ou analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=9), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=10) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=9). *p<0,05 versus controle.....41

Figura 14. Expressão gênica de IL-10 em músculos sóleos analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste *t-student* para verificar diferença entre os grupos: barra preta (1ª sessão – 24 h, n=5) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=5). ^ap<0,05 versus 1ª sessão – 24 h.....41

Figura 15. Expressão gênica de YM1 em músculos sóleos analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste *t-student* para verificar diferença entre os grupos: barra preta (1ª sessão – 24 h, n=6) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=9). ^ap<0,05 versus 1ª sessão – 24 h.....42

Figura 16. Expressão gênica de Fizz-1 em músculos sóleos controle ou analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=7), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=7) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=9). *p<0,01 versus controle; ^ap<0,001 versus 1ª sessão – 24 h.....42

Figura 17. Expressão gênica de Arginase-1 em músculos sóleos controle ou analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=7), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=7) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=9). *p<0,01 vs controle; ^ap<0,001 vs 1ª sessão – 24 h.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de primers utilizados na PCR em tempo real. F: forward; R: reverse.....34

Tabela 2. Peso corporal (PC; g) e peso muscular (PM; mg) dos grupos controle, 1^a e 2^a sessão – 24 h e 3 dias. Valores expressos em média \pm desvio padrão. Grupos controle (n= 15), 1^a sessão – 24 h (n=14), 2^a sessão – 24 h (n=16), 1^a sessão – 3 dias (n=5) e 2^a sessão – 3 dias (n=3). Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos de múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos.....35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-C - Acoplamento-excitação
AL - Adutor longo
Arg-1 - Arginase-1
BB - Bíceps braquial
CCR2 - Receptor de MCP-1/CCL2
CD68 - *cluster* de diferenciação 68
CD163 - *Clusters* de diferenciação 163
CD206 - *Clusters* de diferenciação 206
cDNA - DNA complementar
CK - Creatina quinase
CLT - Cabeça longa do tríceps
COX - Ciclo-oxigenase-2
CTX - Cardiotoxina
DAPI - *4,6-diamidino-2-phenylindole*
DEPC - Dietilpirocarbonato
DMD - Distrofia Muscular de Duchenne
dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT - Ditioneitol
DVL - Porção profunda do vasto lateral
EBD - Evans Blue Dye
ECR - Efeito da Carga Repetida
EDL - Extensor longo dos dedos
EE - Eletroestimulação
EMG - Eletromiográfico
Fizz-1 - Achada em zona inflamatória-1
GAS - Gastrocnêmio
HE - Hematoxilina e Eosina
H₂O UP - Água ultra pura
HSP - Proteína de choque térmico
IC - Complexo imune
IFN- γ - Interferon-gama
IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL-1 - Interleucina-1
IL-1R - Receptor de IL-1
IL-4 - Interleucina-4
IL-6 - Interleucina-6
IL-10 - Interleucina-10
IL-12 - Interleucina-12
IL-13 - Interleucina-13
IL-23 - Interleucina-23
iNOS - Óxido Nítrico Sintase induzível
LPS - Lipopolissacarídeo
M1 (ED1⁺) - Macrófago pró-inflamatório
M2 (ED2⁺) - Macrófago anti-inflamatório
MCP-1 (CCL2) - Proteína quimioatraente de monócito-1
MMPs - Metaloproteinases
NF κ B - Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

PBS - Tampão fosfato salino
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PFA - Paraformaldeído
PTX3 - Pentraxina longa 3
QD - Quadríceps
RF - Reto femoral
RMP - Rigidez muscular passiva
ROS - Espécies reativas de oxigênio
RT - Transcrição reversa
SOL - Sóleo
STAT3 - Fator transdutor de sinais e ativador de transcrição 3
STAT6 - Fator transdutor de sinais e ativador de transcrição 6
TA - Tibial anterior
TB - Tríceps braquial
TGF- β - Fator de Crescimento e Transformação Beta
Th1- T-helper 1
Th2 - T-helper 2
TLR - Receptor *Toll-like*
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral-alfa
TS - Tríceps sural
VL – Vasto lateral
VO_{2max} - Consumo máximo de oxigênio
YM1 - Citocina quimiotática de eosinófilo

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Características gerais do músculo esquelético	16
1.2 Exercício excêntrico	17
1.3 Efeito da carga repetida	21
1.4 Lesão e processo inflamatório	24
1.5 Justificativa e relevância do estudo	28
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Animais	30
3.2 Grupos experimentais	30
3.3 Protocolo de exercício excêntrico	30
3.4 Histologia	31
3.5 Análise morfométrica	32
3.6 Isolamento de RNA total	32
3.7 Transcrição reversa (RT)	33
3.8 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	33
3.9 Análise estatística	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Peso corporal e muscular	35
4.2 Morfologia	35
4.3 Expressão gênica	39
4.3.1 <i>Expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias</i>	39
4.3.2 <i>Expressão gênica de citocinas anti-inflamatórias</i>	41
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do músculo esquelético

O músculo esquelético é innervado e vascularizado, representando em torno de 50% da massa do corpo humano (Karagounis, Hawley, 2010; Yusuf, Brand-Saberi, 2012). Composto por fibras musculares e tecido conjuntivo (epimísio, perimísio e endomísio), o músculo esquelético atua como um arcabouço de sustentação do esqueleto, permitindo a movimentação coordenada do corpo (Bassel-Duby, Olson, 2006; Keynes, Aidley, 2001; Powers, Howley, 2005). Além disso, o músculo esquelético participa do metabolismo servindo de reserva de substratos (por exemplo, glicogênio e proteína) e auxilia na homeostase da temperatura corpórea (Donati et al., 2013; Zanou, Gailly, 2013).

Cada fibra muscular contém diversos núcleos periféricos e miofibrilas que são estruturas alongadas compostas por sarcômeros, unidades funcionais contráteis do músculo esquelético (Junqueira, Carneiro, 2008; Keynes, Aidley, 2001; Lieber, 2002; Tajsharghi, 2008). Os sarcômeros são constituídos principalmente por filamentos de actina e miosina (Clark et al., 2002; MacIntosh et al., 2006), os quais sobrepostos garantem o padrão estriado ao longo da fibra muscular esquelética.

Além das características mencionadas, a musculatura esquelética apresenta alta plasticidade frente à ausência ou à presença de estímulos (Harridge, 2007; Karagounis, Hawley, 2010; Pette, 2001), podendo atrofiar (Jackman, Kandarian, 2004), hipertrofiar (D'Antona et al., 2006; Zanou, Gailly, 2013), promover a conversão de tipos de fibras musculares (Tiidus, 2008) ou se regenerar após uma lesão (Jarvinen et al., 2005; Quintana et al., 2015). Dentre os possíveis estímulos lesivos como, por exemplo, a exposição à cardiotoxina (CTX) (Liu et al., 2014), ao cloreto de bário (Hong et al., 2012), à queimadura (Diaz et al., 2015) e às lacerações (Jarvinen et al., 2005), decidimos focar no estresse mecânico promovido pelo exercício excêntrico (Armstrong et al., 1983; Touchberry et al., 2012).

1.2 Exercício excêntrico

Durante a contração muscular, duas variáveis podem ser mensuradas: o comprimento e a tensão muscular (Keynes, Aidley, 2001). Na contração isométrica, a força é gerada sem alterar o comprimento do músculo (Roig et al., 2010). Na contração isotônica concêntrica, a força contrátil muscular é maior do que a resistência externa, produzindo um encurtamento muscular (Neumann, 2011). Por outro lado, na contração isotônica excêntrica a resistência externa é maior do que a força contrátil do músculo, promovendo um estiramento das fibras musculares associado à tensão muscular (Enoka, 1996).

Após prolongadas contrações isométricas ou concêntricas o músculo esquelético de humanos apresenta fadiga, porém por um curto período, sendo capaz de recuperar a função muscular dentro de uma a duas horas (Walsh et al., 2004). No entanto, após uma série de contrações excêntricas em sujeitos destreinados ocorre não apenas o desgaste físico como também a significativa perda de força muscular (Nosaka, Newton, 2002a; Proske, Allen, 2005). Além disso, a musculatura se torna rígida e dolorida a partir de aproximadamente 6 a 8 horas após o exercício, tendo um pico em 48 horas. Estes efeitos ocorrem porque as contrações excêntricas podem acarretar em lesão muscular (Morgan, 1990; Proske et al., 2004; Schiaffino, Partridge, 2008).

No mecanismo de contração muscular, à medida que o sarcômero vai sendo estirado, a força ativa (gerada pelos componentes contráteis do músculo esquelético) aumenta, sendo máxima onde há maior sobreposição das cabeças de miosina com os filamentos de actina, formando as chamadas pontes cruzadas. Este comprimento ótimo ou ideal é próximo ao comprimento de repouso, em torno de 2.4 μm (Edman, 2005), em modelo animal. Conforme o sarcômero continua sendo estirado (mecanismo que ocorre durante a contração excêntrica), há uma diminuição da sobreposição dos filamentos de actina e miosina, reduzindo a formação das pontes cruzadas, promovendo a queda da força ativa (Edman, 2005; Martini et al., 2009; Neumann, 2011) (Figura 1).

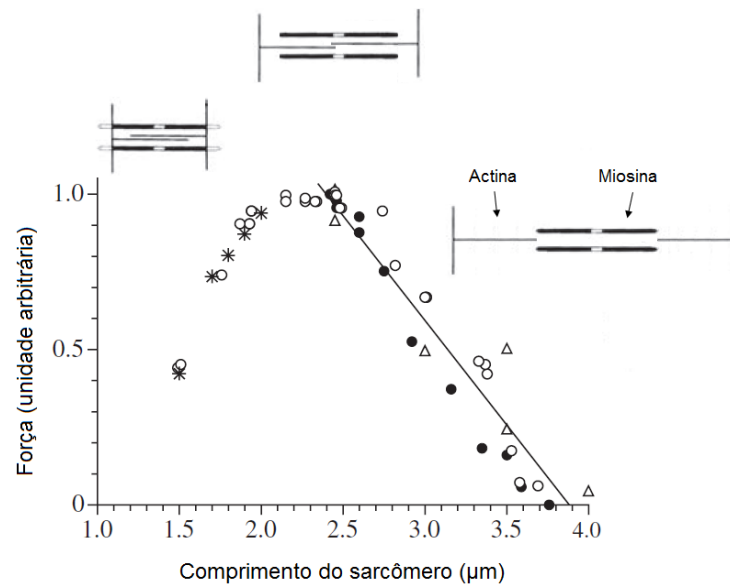


Figura 1: Curva força tetânica-comprimento do sarcômero registrada em fibras musculares isoladas de camundongos. Força tetânica máxima próxima a 2.4 μm de comprimento do sarcômero. Ilustração esquemática mostra sarcômero encurtado (<1.7 μm), comprimento ideal e estirado (>3.0 μm). Adaptado de (Edman, 2005).

Neste momento, componentes elásticos presentes nos sarcômeros como a proteína titina que promove a ancoragem dos filamentos de miosina aos discos Z (região que delimita cada sarcômero) e a proteína estrutural desmina que une os discos Z adjacentes e aqueles localizados nas extremidades das fibras musculares (Morgan, Allen, 1999; Tajsharghi, 2008), oferecem resistência ao estiramento dos sarcômeros, a chamada tensão passiva, de forma a manter e aumentar a produção de força total do músculo (Enoka, 2002) (Figura 2).

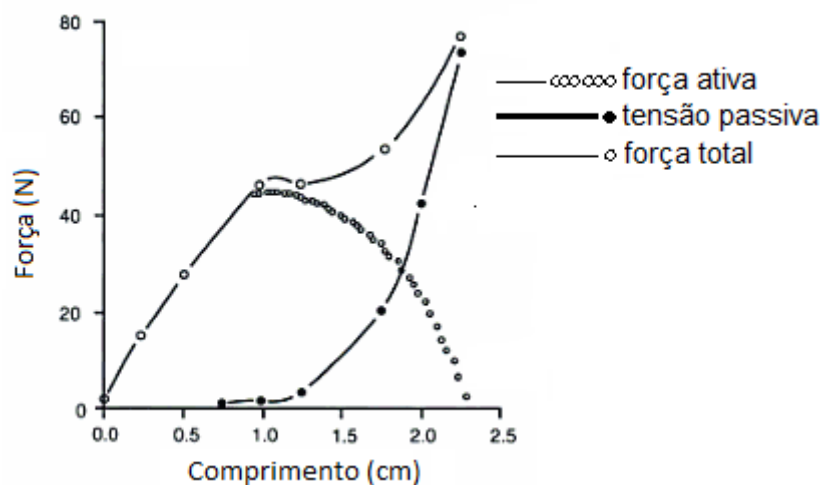


Figura 2: Curva força-comprimento do músculo. Participação de elementos ativos (curva parabólica) e passivos (círculos fechados) na produção total de força muscular (círculos abertos). Adaptado de Enoka (2002).

Posteriormente, após cessar a contração excêntrica, a actina e a miosina se reaproximam e se sobrepõem novamente, mecanismo que não ocorre em todos os sarcômeros, possivelmente devido à distribuição não uniforme dos componentes elásticos ao longo dos sarcômeros (Morgan, 1990; Proske, Morgan, 2001). Estes, por sua vez, ao serem submetidos a uma nova contração excêntrica recebem a sobrecarga apenas sobre os elementos elásticos podendo, assim, ocorrer a ruptura do sarcômero, o chamado “*popping*” (Morgan, 1990). O aumento do estiramento das proteínas titina e desmina pode permitir o estiramento do sarcômero “vizinho”, em série, propagando o dano longitudinalmente (Allen, 2001) (Figura 3).

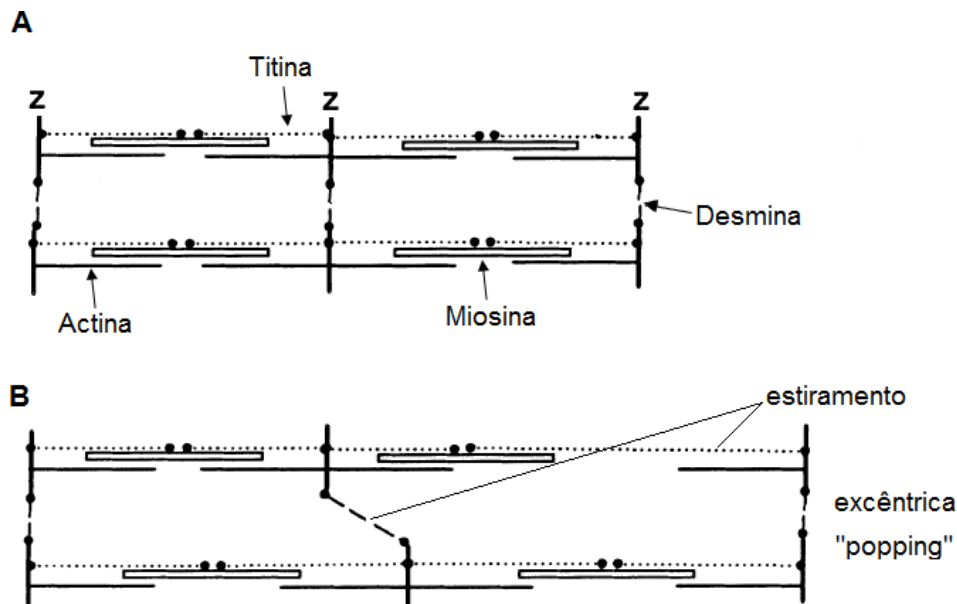


Figura 3: Diagrama de quatro sarcômeros “vizinhos”. (A) Organização normal próxima ao comprimento ótimo. Arranjo estrutural dos filamentos contráteis (actina e miosina) e elásticos (titina e desmina), delimitados pelos discos Z. (B) Possível disposição organizacional após 30% de estiramento. Na região superior, metade de um sarcômero é superestendido (à direita) e o outro sarcômero vizinho tem o seu comprimento mantido. Abaixo, os dois sarcômeros vizinhos são estirados proporcionalmente. Adaptado de (Allen, 2001).

Tem sido proposto que o evento inicial desencadeador do insulto após contrações excêntricas seja o rompimento do sarcômero. Não obstante, tal proposição não parece ser universalmente aceita, visto que a disfunção no sistema acoplamento-excitação (A-C) entre a actina e a miosina é sugerida como um processo biológico que antecede a ruptura do sarcômero; ou seja, as contrações excêntricas promoveriam o mau funcionamento de uma série de mecanismos envolvendo desde a liberação de neurotransmissores na junção neuromuscular,

como a acetilcolina, até a liberação de Ca^{2+} proveniente do retículo sarcoplasmático (Warren et al., 2001). Ainda assim, há um consenso na literatura quanto aos eventos consequentes às contrações excêntricas e ao superestiramento dos sarcômeros: ruptura do sarcômero, destruição dos túbulos-T (projeções do sarcolema perpendiculares às fibras musculares), disfunção no sistema A-C dos miofilamentos, queda da força ativa, danos às cisternas do retículo sarcoplasmático, aumento do influxo de Ca^{2+} intracelular e da tensão passiva, findando em processo de proteólise e necrose das fibras musculares (Jarvinen et al., 2005; Proske, Allen, 2005; Proske, Morgan, 2001). De acordo com a extensão da lesão, os sintomas como dor muscular, edema, redução da amplitude de movimento e diminuição da força muscular podem permanecer por até duas semanas (Clarkson, Tremblay, 1988; Proske et al., 2004; Schiaffino, Partridge, 2008).

Em humanos, diversos exercícios físicos são utilizados para o estudo das contrações excêntricas, dentre os quais envolvem: o uso de step, analisando o músculo quadríceps (QD) da perna que faz apenas a subida (contração concêntrica) e o mesmo grupo muscular contralateral que faz somente a descida (contração excêntrica) (Newham et al., 1983); contrações excêntricas máximas de flexão de cotovelo envolvendo os músculos bíceps braquial (BB), braquial e tríceps braquial (TB) (Nosaka et al., 2001); flexão plantar avaliando o músculo tríceps sural (TS) (Yanagisawa et al., 2010). Em animais, é mais comum o uso de esteiras motorizadas, com inclinação negativa, para induzir as contrações excêntricas (Armstrong et al., 1983; Lehti et al., 2007; Silva, Bom et al., 2013). No entanto, modelos experimentais de eletroestimulação (EE) *in vivo* também são recursos aplicáveis (Sakurai et al., 2013; Vijayan et al., 2001). Ensaio *ex-vivo* igualmente abarcam outras possibilidades, como o estiramento de sarcômeros conectados em série (Morgan, 1990) e a EE de fibras musculares isoladas de camundongos (Balnave et al., 1997).

Grande parte dos trabalhos publicados com animais analisou, predominantemente, os músculos gastrocnêmio (GAS) e sóleo (SOL) (Isanejad et al., 2015; Liao et al., 2010; Touchberry et al., 2012). Provavelmente, a aparente preferência por estes músculos seja devido ao padrão biomecânico de recrutamento dos mesmos durante a execução da corrida em descida. Em inclinação negativa, os músculos locomotores antigravitacionais (posturais) promovem primariamente contrações excêntricas, desacelerando (aceleração negativa) o centro de massa do

animal de modo que uma velocidade média constante de corrida, com relação às passadas, seja mantida (Armstrong et al., 1983; Margaria, 1968; Walmsley et al., 1978).

Estudos controversos defendem que após EEs tetânicas excêntricas houve maior ocorrência de dano em fibras musculares do tipo II (músculo adutor longo (AL) de ratos Sprague Dawley) (Vijayan et al., 2001), enquanto que após o protocolo de corrida em esteira (descida) animais da mesma espécie apresentaram maior injúria e acúmulo de macrófagos em fibras do tipo I (<5% - grupos musculares antigravitacionais) (Armstrong et al., 1983). Hody et al. (2013) mostraram que após o treinamento excêntrico em esteira (cinco sessões) houve aumento da proporção de fibras musculares dos fenótipos I e IIa e redução do tipo IIb, no músculo reto femoral (RF) de camundongos C57BL/6. Portanto, protocolos distintos de exercício excêntrico causam diferentes alterações estruturais, as quais necessitam ser mais bem compreendidas.

1.3 Efeito da carga repetida

Como previamente mencionado, as contrações excêntricas podem acarretar em lesão muscular. Todavia, ao realizar uma segunda sessão de exercício excêntrico, há minimização da lesão muscular com conseqüente atenuação da dor e da perda de força muscular (Paulsen et al., 2009; Proske, Allen, 2005; Proske, Morgan, 2001). Esse fenômeno, uma espécie de mecanismo protetor, é conhecido como “Efeito da Carga Repetida” (ECR) (Hubal et al., 2008; Nosaka, Clarkson, 1995; Vissing et al., 2009). Trabalhos têm relatado que o efeito da carga repetida ocorre quando se aplica um intervalo de dias ou semanas entre a primeira e a segunda sessão de exercício excêntrico (Brockett et al., 2001; Nosaka et al., 2001).

Tem sido descrito que este efeito protetor é promovido pela 1ª sessão, não tendo benefícios adicionais após a 2ª sessão (Silva, 2007). Outrossim, evidências mostram que duas, seis ou mais contrações excêntricas máximas propiciam proteção tanto à 24 quanto à 50 contrações excêntricas máximas (Brown et al., 1997; Nosaka et al., 2001). Apesar disso, sugere-se que a intensidade do estímulo mecânico aplicada em ambas as sessões deva ser a mesma, posto que o treinamento excêntrico submáximo (nove semanas) não promoveu proteção para a sessão subsequente de exercício excêntrico máximo (Nosaka, Newton, 2002b).

Os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não foram sistematicamente investigados. No entanto, McHugh (2003) propõe que adaptações neurais, mecânicas e celulares estariam envolvidas nesse mecanismo “protetor”. As alterações neurais são provenientes de análises realizadas em humanos, avaliando o sinal eletromiográfico (EMG), sendo observado um aumento da amplitude deste sinal após a 1ª sessão de treinamento, sugerindo um aumento na proporção de fibras ativadas; assim como, uma redução da frequência mediana do mesmo, após a 2ª sessão, aludindo uma possível ativação de fibras do tipo I (mais resistentes à fadiga) (McHugh et al., 2001; Warren et al., 2000). Todavia, outro trabalho (Sacco, Jones, 1992) realizado com EEs (sem influência da contração muscular voluntária) em músculo tibial anterior (TA) de camundongos não menciona adaptações neurais relacionadas ao efeito da carga repetida.

As adaptações mecânicas permeiam por alterações mais periféricas, advindas de treinamento com exercício excêntrico e não apenas uma sessão, envolvendo componentes elásticos do músculo esquelético (McHugh, 2003). Enquanto o aumento da rigidez muscular passiva (RMP) foi interpretado como uma contribuição positiva das proteínas do citoesqueleto para a manutenção estrutural dos sarcômeros em músculo TB de ratos treinados por oito semanas em corrida na descida (Reich et al., 2000), indícios anteriores encontrados em humanos indicaram maior susceptibilidade ao dano nos músculos isquiotibiais de sujeitos que apresentaram aumento da RMP após 60 contrações excêntricas isocinéticas (McHugh et al., 1999). A proteína estrutural desmina também tem sido alvo de controvérsias, pois um estudo realizado com camundongos *knockout* para esta proteína sugeriu uma redução da RMP e menor susceptibilidade ao estresse mecânico quando comparado aos animais selvagens, ambos submetidos à EEs excêntricas em músculos extensor longo dos dedos (EDL) (Sam et al., 2000). Divergindo desses achados, Barash et al. (2002) relataram um aumento da expressão proteica de desmina em 72 a 168 h após uma única sessão de 30 EEs excêntricas em músculo TA de ratos, e este evento tem sido associado a um possível remodelamento dos filamentos intermediários no intuito de promover uma espécie de reforço aos sarcômeros frente ao futuro dano repetido. Sendo assim, as possíveis alterações estruturais envolvidas na mecânica muscular que poderiam explicar a atenuação do dano após a carga repetida necessitam, ainda, serem mais bem exploradas.

A terceira vertente abordada se norteia por adaptações celulares. Evidências mostram um aumento no número de sarcômeros em série das fibras musculares após as contrações excêntricas, o que resultaria no aumento do comprimento ótimo do músculo, ou seja, comprimento em que se obtém a máxima força contrátil (Brockett et al., 2001; Ciciliot, Schiaffino, 2010; Lynn et al., 1998; Morgan, 1990). Ainda no âmbito ultraestrutural, disfunções no sistema A-C entre os miofilamentos contráteis promoveram uma perda de força muscular (50-75%) nos primeiros cinco dias após EEs excêntricas máximas em modelo animal (Warren et al., 2001). Contudo, a perda de força muscular imediatamente após o exercício excêntrico também ocorre após a carga repetida, só que em menor intensidade (Clarkson, Tremblay, 1988).

Vissing et al. (2009) mostraram elevados níveis de expressão gênica e proteica de proteínas de choque térmico (HSPs) no músculo esquelético após lesão por exercício excêntrico, em humanos, com posterior atenuação dos mesmos após a sessão repetida. Corroborando com estes achados, Touchberry et al. (2012) revelaram que ao induzir a expressão de HSP72 no músculo esquelético por estímulo térmico, os ratos submetidos ao exercício excêntrico, em esteira, tiveram menor dano quando comparado aos animais que foram submetidos apenas ao exercício excêntrico. Ambos os estudos sugerem que essas proteínas, conhecidas na literatura como chaperonas e envolvidas na proteção celular (Clark et al., 2002), poderiam estar atuando como coadjuvantes ao ECR.

A resposta inflamatória é outro mecanismo que vem sendo explorado. Hubal et al. (2008) verificaram um aumento da expressão gênica da proteína quimioatraente de monócito-1 ou "*CC chemokine ligand 2*" (MCP-1/CCL2) em músculo vasto lateral (VT) de humanos, e sua posterior co-localização no tecido muscular (por imunohistoquímica) com macrófagos e Pax7 (marcador de células satélites quiescentes e ativadas), após a 2ª sessão de contrações excêntricas. Os autores especulam que a sinalização desta citocina vinculada à presença de células inflamatórias e à maior ativação de células precursoras miogênicas poderia, em conjunto, favorecer a resposta regenerativa da musculatura esquelética frente à injúria promovida pelo exercício excêntrico.

Em outro estudo, ratos Wistar submetidos às EEs excêntricas (músculos dorsiflexores do tornozelo, em flexão plantar) e ao tratamento com o fármaco Diclofenaco (anti-inflamatório) tiveram menor perda de força muscular e metade da

concentração de subpopulações de macrófagos ED1⁺ e ED2⁺, em dois dias após a 1ª sessão, quando comparados ao grupo placebo. No entanto, em ambos os períodos (dois e sete dias) após a 2ª sessão, os grupos tratados com o anti-inflamatório apresentaram queda da força muscular e aumento na concentração de subpopulações de macrófagos (especialmente ED2⁺), com grau mais proeminente no grupo tratado por sete dias (Lapointe et al., 2002). Os autores aludem que a mitigação da inflamação promovida pelo fármaco após a 1ª sessão pode ter prejudicado a fagocitose e a remoção de debris por macrófagos ED1⁺, protelando ou dificultando o processo de regeneração do músculo esquelético. Esses dados dão suporte às hipóteses de adaptações celulares, com ênfase na resposta imune.

Sendo assim, neste contexto, cabe adentrar aos mecanismos desencadeados após a injúria muscular e conseqüente processo inflamatório.

1.4 Lesão e processo inflamatório

Ao sofrer uma lesão da fibra muscular, não somente os sarcômeros como também a rede de vasos sanguíneos presente ao longo das fibras musculares são danificados. Tal evento acarreta em uma resposta do sistema imunológico através da migração de neutrófilos para o tecido muscular em períodos mais agudos após lesão (1-6 h), seguida de infiltração de macrófagos em períodos mais tardios (~48 h), os quais fagocitam fibras musculares necrosadas e secretam citocinas inflamatórias, dentre outras funções (Arnold et al., 2007; Balnave et al., 1997; Grefte et al., 2007; Jarvinen et al., 2005; Saclier, Cuvellier et al., 2013).

De maneira geral, os macrófagos são classificados em dois subtipos: M1 (ED1⁺) e M2 (ED2⁺), sendo que o M2 pode ser subclassificado em M2a, M2b e M2c (Figura 4) (Saclier, Yacoub-Youssef et al., 2013). Os macrófagos M1 são pró-inflamatórios e quando induzidos por citocinas Th1 (*T-helper 1*), como Interferon-gama (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- α), secretam citocinas pró-inflamatórias como a Interleucina-1beta (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-23 (IL-23), MCP-1 e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Arnold et al., 2007; Kharraz et al., 2013; Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008). Além disso, tais macrófagos possuem funções microbicida e tumoricida, estão envolvidos na proliferação de células precursoras miogênicas e induzem o aumento da expressão das enzimas Ciclo-oxigenase-2 (COX2) e Óxido Nítrico

Sintase induzível (iNOS) (Ichikawa et al., 2009; Saclier, Yacoub-Youssef et al., 2013; Sindrilaru et al., 2011).

Os macrófagos M2 (a, b e c) são anti-inflamatórios, sendo induzidos por citocinas Th2 (*T-helper 2*), como Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-13 (IL-13), e expressam citocinas como a Arginase-1 (Arg-1), YM1 (Citocina quimiotática de eosinófilo), Fizz-1 (Achada em zona inflamatória-1) e Interleucina-10 (IL-10), além dos marcadores de superfície celular CD206 e CD163 (*clusters* de diferenciação) (Nair et al., 2003; Saclier, Yacoub-Youssef et al., 2013). Os macrófagos M2a estão envolvidos na síntese de matriz extracelular, angiogênese, fagocitose e desenvolvimento de fibrose (Wynn, 2004). Os macrófagos M2b participam do processo de imunorregulação, ao passo que o subtipo M2c secreta citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento, tais como IL-10 e Fator de Crescimento e Transformação Beta (TGF- β), respectivamente, promovendo a deposição de matriz extracelular e remodelamento tecidual (Mantovani et al., 2004). Além disso, os macrófagos M2a e M2c estão associados ao processo de diferenciação das células precursoras miogênicas durante a miogênese (Saclier, Yacoub-Youssef et al., 2013).

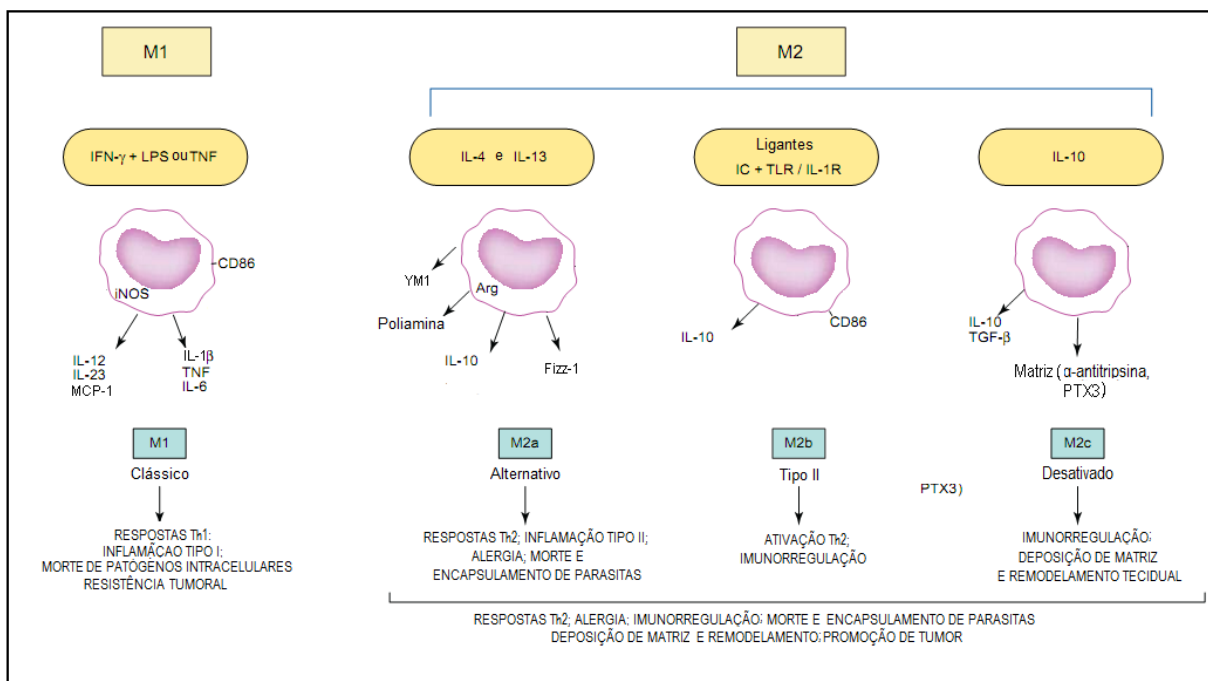


Figura 4: Indutores e propriedades funcionais de diferentes subpopulações de macrófagos. Polarização de macrófagos e secreção de citocinas e fatores de crescimento em resposta aos sinais derivados do microambiente. IFN- γ , LPS e TNF- α orquestram a polarização de macrófagos M1 em respostas antitumorais, enquanto IL-4 e IL-13, IC+TLR e agonista IL-1R, e IL-10 induzem macrófagos M2a (alergia e fagocitose), M2b (imunorregulação) e M2c (deposição de matriz extracelular e remodelamento tecidual), respectivamente. Abreviações:

LPS, Lipopolissacarídeo; IC, Complexo imune; TLR, Receptor *Toll-like*; IL-1R, Receptor de IL-1; CD68, *cluster de diferenciação* 68; PTX3, Pentraxina longa 3, Adaptado de (Mantovani et al., 2004).

Dentre estas citocinas, o TNF- α (26kDa) (secretado por macrófagos M1) é expresso na membrana plasmática. A clivagem do mesmo por metaloproteinases (MMPs) da matriz extracelular libera uma forma madura solúvel de 17kDa. Ambas as formas (26kDa e 17kDa) são biologicamente ativas e se associam aos receptores TNFR1 e TNFR2, sendo que o primeiro está presente em todas as células e possui um domínio que o habilita para a apoptose, e o segundo é restrito a certos tipos de células, podendo distinguir o TNF- α a partir de espécies diferentes (Palladino et al., 2003).

Além de estimular os macrófagos M1, o TNF- α exerce um papel importante na inflamação aguda e crônica, em respostas antitumorais e na infecção (Palladino et al., 2003; Saclier, Cuvellier et al., 2013). Tal citocina é produzida por linfócitos T, células *natural killer* e neurônios, e sua transcrição depende da ativação do Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NFkB) (Peterson et al., 2006; Rao et al., 2010). O NFkB responde a estímulos nocivos como o aumento da expressão de ROS, o próprio TNF- α , IL-1 β e LPS, ativando a transcrição de genes envolvidos com a proliferação celular, inflamação e funções anti-apoptóticas (Ghosh, Hayden, 2008).

Peterson et al. (2006) mostraram que camundongos tratados por sete dias com TNF- α exógeno por meio da implantação de minibombas osmóticas (região dorsal subcutânea) tiveram um acúmulo de neutrófilos e macrófagos nos músculos EDL e SOL, quando comparados ao grupo placebo, sem sinais de lesão ou atrofia, sugerindo que o TNF- α atua na sinalização celular, causando a migração dessas células inflamatórias para o músculo esquelético.

A citocina iNOS, analogamente, tem se apresentado importante na modulação da resposta imune frente à lesão por CTX. Recentemente, Rigamonti et al. (2013) demonstraram que camundongos *knockout* para iNOS apresentaram altos níveis de quimiocinas, maior infiltração de neutrófilos, persistência de macrófagos, bem como um prejuízo na proliferação e diferenciação de células precursoras miogênicas no tecido muscular lesado.

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória associada à atividade de células imunes fagocitárias (Burdzinska et al., 2014). Um trabalho envolvendo camundongos *knockout* para a citocina IL-6 observou que houve diminuição da infiltração de

macrófagos no tecido muscular em cinco dias após lesão com CTX associada a menores níveis de expressão gênica de MCP-1, IL-1 β e iNOS, além do aumento da fibrose intersticial (Zhang et al., 2013), inculindo uma notável correlação entre a migração de células inflamatórias e a secreção de citocinas pró-inflamatórias na recuperação do músculo esquelético lesado.

A citocina MCP-1 e o seu respectivo receptor (“*CC chemokine receptor 2*” - CCR2) podem acometer a angiogênese e a regeneração do músculo esquelético de várias formas (Moore et al., 2015), tendo sido referidos com relevante função no decurso da inflamação após o dano muscular (Shireman et al., 2007). Martinez et al. (2010) mostraram prejuízos no recrutamento de macrófagos após lesão por CTX em animais *knockout* para esta citocina e o seu receptor, além do posterior acúmulo de adipócitos na musculatura esquelética.

YM1 é uma citocina anti-inflamatória induzida por citocinas IL-4 e IL-13 e está envolvida na via de sinalização IL-4/STAT6 (“*Signal transducer and activator of transcription factor 6*”), a qual medeia a indução do fenótipo M2 em macrófagos (Dasgupta et al., 2011; Mandal et al., 2011). Células-T esplênicas e mastócitos isolados de camundongos com deficiência nesta via não apresentaram a expressão proteica dessa citocina durante peritonite alérgica (Welch et al., 2002).

A citocina Fizz-1 é rica em cisteína e está associada à inflamação pulmonar, tendo suas isoformas expressas em tecidos específicos e com atividades biológicas distintas, em camundongos e humanos (Holcomb et al., 2000). Tal citocina é altamente expressa durante respostas imunes induzidas por citocinas Th2, atuando como uma supressora da inflamação e da fibrose pulmonar e hepática (Pesce, Ramalingam, Wilson et al., 2009).

A citocina Arg-1 é altamente expressa por macrófagos M2, e é responsável por catalisar a produção de poliaminas, as quais são necessárias para a síntese de colágeno, proliferação celular, fibrose e outras funções relacionadas com remodelamento tecidual (Pesce, Ramalingam, Mentink-Kane et al., 2009). A supressão de IFN- γ em camundongos com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) resultou em alta expressão gênica de Arg-1, Fizz-1 e IL-4 no músculo esquelético quando comparada aos músculos dos animais que apresentavam apenas DMD, com conseqüente redução da lesão muscular, sugerindo um importante papel dessas citocinas anti-inflamatórias durante o processo inflamatório recorrente em DMD (Villalta et al., 2011).

Altas concentrações de IL-10 podem ocorrer na tentativa de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (MacKenzie et al., 2014). Macrófagos isolados de músculo esquelético de camundongos com DMD e tratados com IL-10 apresentaram aumento da expressão proteica de Arginase, coincidindo temporalmente com o período de surgimento da fibrose em músculo cardíaco e esquelético (Wehling-Henricks et al., 2010).

Assim, com respaldo nos trabalhos explorados, decidimos investigar o efeito de sessão repetida de exercício excêntrico sobre a expressão de genes pró e anti-inflamatórios no músculo esquelético de camundongos selvagens.

1.5 Justificativa e relevância do estudo

Diante da importância da integridade muscular para a manutenção da qualidade de vida e para a prática de atividade física, torna-se cada vez maior o interesse na investigação de estratégias capazes de maximizar a resposta regenerativa da musculatura esquelética. Neste contexto, o estudo do possível efeito protetor gerado por sessão repetida de exercício excêntrico na musculatura esquelética ainda é pouco explorado. Portanto, este estudo visou contribuir para o melhor entendimento do efeito da carga repetida sobre a musculatura esquelética, em especial, a expressão de genes pró e anti-inflamatórios após o dano promovido pelo exercício excêntrico, por meio da investigação de aspectos morfológicos e moleculares. Além disso, este estudo poderá servir de base para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas no intuito de otimizar o processo regenerativo muscular após lesão provocada por exercício excêntrico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo investigar o efeito de sessão repetida de exercício excêntrico na expressão de genes pró e anti-inflamatórios no músculo esquelético de camundongos.

2.2 Objetivos específicos

Objetivo 1: Estudar o efeito da carga repetida sobre os aspectos macroscópicos e histológicos do músculo sóleo de camundongos jovens analisado em 24 h e 3 dias após duas sessões de exercício excêntrico.

Objetivo 2: Avaliar o efeito da carga repetida sobre a expressão gênica de citocinas pró (TNF- α , iNOS, IL-1 β e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10, YM1, Fizz-1 e Arg-1) no músculo sóleo de camundongos jovens analisado em 24 h após duas sessões de exercício excêntrico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos jovens (idade: 2-3 meses) da linhagem CB6F1, aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB/USP, protocolo nº 044/05/03, mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas padrão contendo maravalha, água e ração *ad libitum*, com regime claro/escuro de 12h/12h.

3.2 Grupos experimentais

Controle: os camundongos tiveram o músculo sóleo de ambas as patas removido e analisado sem ter sido previamente submetido a algum procedimento experimental.

Submetido à 1ª sessão: os camundongos tiveram o músculo sóleo de ambas as patas removido e analisado em 24 h e 3 dias após uma sessão de exercício excêntrico.

Submetido à 2ª sessão: os camundongos tiveram o músculo sóleo de ambas as patas removido e analisado em 24 h e 3 dias após duas sessões de exercício excêntrico.

3.3 Protocolo de exercício excêntrico

Os animais dos grupos submetidos à 1ª e à 2ª sessão foram familiarizados na esteira por um período de dois dias consecutivos, cada um com a duração de 15 min, em declive de -25° . A velocidade inicial foi de 6 m/min, sendo aumentada para 9 m/min e finalizada com 12 m/min, de modo que cada velocidade foi mantida por 5 min. Ao terceiro dia, um grupo foi submetido a uma primeira sessão de exercício excêntrico caracterizado pela corrida em esteira, com declive de -25° , durante 1 hora e velocidade de 21 m/min. Após duas semanas, uma segunda sessão de exercício excêntrico (contendo os mesmos parâmetros da primeira sessão) foi aplicada aos animais. No protocolo, a velocidade inicial também foi de 6 m/min, com incrementos de 3 m/min (6, 9, 12, 15, 18 e 21 m/min), os quais foram realizados a cada 10 min

corridos. Nosso protocolo foi padronizado com respaldo em modelos experimentais utilizados na literatura (Kawanishi et al., 2013; Lehti et al., 2007; Liao et al., 2010).

Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o peso corporal e o peso úmido dos músculos removidos foram obtidos. Em seguida, os músculos foram armazenados para histologia e biologia molecular. O músculo sóleo foi avaliado em 24 h e 3 dias após uma única sessão de exercício excêntrico ou após duas sessões de exercício excêntrico.

3.4 Histologia

Os fragmentos dos músculos sóleos destinados à histologia foram pré-congelados em isopentano (10 s) e, em seguida, imersos em nitrogênio líquido, sendo estocados em -80 °C. Posteriormente, os músculos foram cortados em criostato (IEC Minotome) a -25° C, gerando secções transversais (10 µm de espessura), as quais foram fixadas rapidamente em lâminas previamente gelatinizadas e armazenadas a -20° C.

Para a coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), as secções histológicas foram fixadas em Paraformaldeído 4% (PFA) durante 2 min e lavadas em água destilada (por 3 vezes). Em seguida, as mesmas foram coradas com Hematoxilina por 2 min e, novamente, lavadas em água destilada (por 3 vezes). Posteriormente, o corante Eosina foi aplicado sobre as secções por 45 s, com subsequente enxague em água destilada (por 3 vezes). Rapidamente, as lâminas foram imersas em álcool 95% (uma passagem), álcool 100% I (5 min), álcool 100% II (5 min), álcool/xilol 1:1 (10 min), xilol I (10 min) e xilol II (10 min), consecutivamente. Ao final, as lâminas foram fechadas com resina (D.P.X - Sigma) e lamínulas. Para análise da morfologia geral do músculo sóleo, essas secções foram analisadas por microscopia de luz (*Nikon Eclipse light microscope - PCM2000*) e as fotomicrografias foram preparadas utilizando o programa *Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems)*.

Para detectar e quantificar a lesão de fibras musculares, imediatamente após o exercício, os animais receberam uma injeção pela veia caudal do corante Evans Blue Dye (EBD) diluído 2% em Tampão fosfato salino (PBS) (200 µl/animal); a injeção do corante também foi aplicada nos animais do grupo controle. A efetividade da injeção foi confirmada pela coloração azul observada nas patas e orelhas.

Secções transversais das porções proximal, distal e ventral dos músculos, fixadas em lâminas, foram incubadas em acetona a -20°C por 10 min, em seguida, lavadas com PBS por 5 min e, por fim, fechadas com lamínulas e resina Vectashield contendo “4,6-diamidino-2-phenylindole” (DAPI). As análises das fotomicrografias foram feitas por microscopia de fluorescência (Observer D1; Zeiss) em 24 h após a injeção, com dupla marcação de DAPI (de fluorescência azul - marcador nuclear) e Rodamina (de fluorescência vermelha – marcador de EBD). EBD é utilizado como um marcador de lesão, visto que o mesmo se liga à albumina e permeia pela circulação, extravazando em locais com rupturas celulares e lesões (Hamer et al., 2002).

3.5 Análise morfométrica

A área total e intersticial das secções transversais dos músculos sóleos e o número de fibras musculares em cada secção foram obtidos a partir de análises morfométricas utilizando-se o programa Image Pro-Plus, Media Cybernetics (Dedkov et al., 2003; Miyabara et al., 2006).

3.6 Isolamento de RNA total

Foram utilizadas amostras de músculos sóleos dos animais dos grupos controle, 1^a e 2^a sessão coletadas em 24 h após o exercício excêntrico. O isolamento do RNA total de cada amostra foi realizado com o reagente TRIZOL (*Invitrogen*[®]), segundo as recomendações do próprio fabricante. Para confirmar a qualidade do processo de isolamento foi utilizada a relação entre as medidas espectrofotométricas 260 e 280 nm (esta relação estima a proporção entre RNA e proteínas). As amostras utilizadas tiveram relação entre 1,6 a 2,0. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1,8% denaturante, corado com brometo de etídeo, no qual foi possível observar a presença das bandas mais evidentes 28 S e 18 S, referentes a RNA ribossomal.

3.7 Transcrição reversa (RT)

Finalizado o isolamento do RNA total e confirmada a sua integridade, realizamos transcrições reversas (RT) utilizando a quantidade de 1 µg de RNA total. A reação de RT foi desenhada da seguinte forma: 1 µg de RNA total e 1 µl de oligo dT sendo completada com água DEPC (Dietilpirocarbonato) até 12,5 µl. Incubamos por 10 minutos a 70 °C em um termocilador. Em seguida, adicionamos um Mix composto por 4 µl de 5x *buffer*, 2 µl de 0,1 mM DTT (Ditioneitol), 1 µl de 0,8 mM dNTPs (Desoxirribonucleotídeos fosfatados) (dnTA, dnTG, dnTC e dnTT) e 0,5 µg de 200 U de transcriptase reversa para cada amostra. Incubamos por 60 minutos a 42 °C. Para finalizarmos, incubamos por 10 minutos a 95 °C, obtendo o DNA complementar (cDNA). A integridade das amostras de cDNA foi verificada em gel de agarose 1% não denaturante, onde se observou um arrastão típico de amostras de cDNA.

3.8 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Em seguida, diferentes frações do produto da RT (cDNA) foram utilizadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) em um equipamento que monitora a amplificação em tempo real (Rotor Gene Q). Os valores foram expressos em *fold* (unidade arbitrária) com as diferenças relativas à expressão do grupo controle. O grupo 1ª sessão foi utilizado como controle quando não houve amplificação do gene de interesse no grupo controle.

A reação foi realizada com o seguinte desenho experimental: 3 µl de cDNA com suas concentrações variando entre 2,075 ng/µl e 33,3 ng/µl; 0,36 µl de primers (*forward e reverse*) na concentração de 300 nM ou 0,49 µl na concentração de 400 nM; 11 µl de Platinum SYBR SuperMix-UDG (contendo a enzima Taq Polimerase, dNTPs e tampão); água ultra pura (H₂O UP) para completar o volume total de 22 µl.

A sequência dos primers das citocinas TNF-α, iNOS, IL-1β, MCP-1, Fizz-1, Arg-1, YM1, IL-10 e TFIID (normalizador) foram obtidos da literatura (Acharyya et al., 2007; Moore et al., 2015; Penas et al., 2015; Rigamonti et al., 2013; Sawant et al., 2012; Silva et al., 2012; Villalta et al., 2011) (Tabela 1) e foram sintetizados pela empresa “Exxtend Biotecnologia Ltda”.

Tabela 1. Sequências de primers utilizados na PCR em tempo real.

NOME	SEQUÊNCIA	RELAÇÃO COM MACRÓFAGOS
TNF-α F	CACAAGATGCTGGGACAGTGA	M1 – pró-inflamatórios
TNF- α R	TCCTTGATGGTGGTGCATGA	M1 – pró-inflamatórios
iNOS F	CTGCAGCACTTGGATCAG	M1 – pró-inflamatórios
iNOS R	CGTACCAGGCCCAATGAG	M1 – pró-inflamatórios
IL-1β F	CCAAAAGATGAAGGGCTGCTTCC	M1 – pró-inflamatórios
IL-1β R	GGATGGGCTCTTCTTCAAAGATG	M1 – pró-inflamatórios
MCP-1 F	GCTCAGCCAGATGCAGTTAAC	M1 – pró-inflamatórios
MCP-1 R	CTCTCTCTTGACCTGGTGAC	M1 – pró-inflamatórios
Fizz-1	GAGACCATAGAGATTATCGTGGA	M2 – anti-inflamatórios
Fizz-1	CACACCCAGTAGCAGTCATC	M2 – anti-inflamatórios
Arginase-1 F	CAATGAAGAGCTGGCTGGTGT	M2 – anti-inflamatórios
Arginase-1 R	GTGTGAGCATCCACCCAAATG	M2 – anti-inflamatórios
YM1 F	GGATGGCTACACTGGAGAAA	M2 – anti-inflamatórios
YM1 R	AGAAGGGTCACTCAGGATAA	M2 – anti-inflamatórios
IL-10 F	ATTTGAATCCCTGGGTGAGAAG	M2 – anti-inflamatórios
IL-10 R	CACAGGGGAGAAATCGATGACA	M2 – anti-inflamatórios
TFIID F	TTAGGCCTGGAAAGGTGTTACG	Normalizador
TFIID R	CCTCCAAACAGATGGAACATTCT	Normalizador

F: forward; R: reverse.

3.9 Análise estatística

O teste “*t-student*” foi utilizado para a comparação entre dois grupos e a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey foi realizada para a comparação múltipla entre mais de dois grupos. O nível de significância estabelecido foi de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Peso corporal e muscular

O peso corporal e o peso do músculo sóleo não foram alterados em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2. Peso corporal (PC; g) e peso muscular (PM; mg) dos grupos controle, 1ª e 2ª sessão – 24 h e 3 dias.

GRUPOS	PC	PM
Controle	27,7±1,9	7,1±1,1
1ª sessão - 24h	29,2±1,8	7,2±0,8
2ª sessão - 24h	28,7±3,3	7±1,3
1ª sessão - 3 dias	30,4±1,3	7,6±0,7
2ª sessão - 3 dias	30,7±1,8	7,2±0,3

Valores expressos em média \pm desvio padrão. Grupos controle (n= 15), 1ª sessão – 24 h (n=14), 2ª sessão – 24 h (n=16), 1ª sessão – 3 dias (n=5) e 2ª sessão – 3 dias (n=3). Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos de múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos.

4.2 Morfologia

As análises histológicas das secções transversais musculares coradas com HE mostraram aparente aumento da área intersticial em 24 h e 3 dias após uma sessão de exercício excêntrico (Figura 5B e 5D, respectivamente), com diminuição da mesma (79,6% e 56,3 %, respectivamente), nos mesmos períodos, após uma segunda sessão de exercício excêntrico (Figura 5C e 5E, respectivamente). Nas fotomicrografias a seguir observamos que após uma sessão de exercício os músculos destes animais apresentaram áreas claras entre as fibras musculares, o que sugere a formação de edema, quando comparados aos músculos de animais do grupo controle (Figura 5A). Todavia, os músculos dos animais submetidos a duas sessões de exercício excêntrico mostraram notável diminuição da extensão dessas áreas claras entre as fibras musculares (Figura 5C), apresentando morfologia mais semelhante ao grupo controle. Resultados similares mostraram que os músculos avaliados em 3 dias após uma ou duas sessões de exercício excêntrico também

apresentam as mesmas características observadas nos músculos analisados em 24 h após o exercício excêntrico, mas com aparente menor extensão dessas áreas claras.

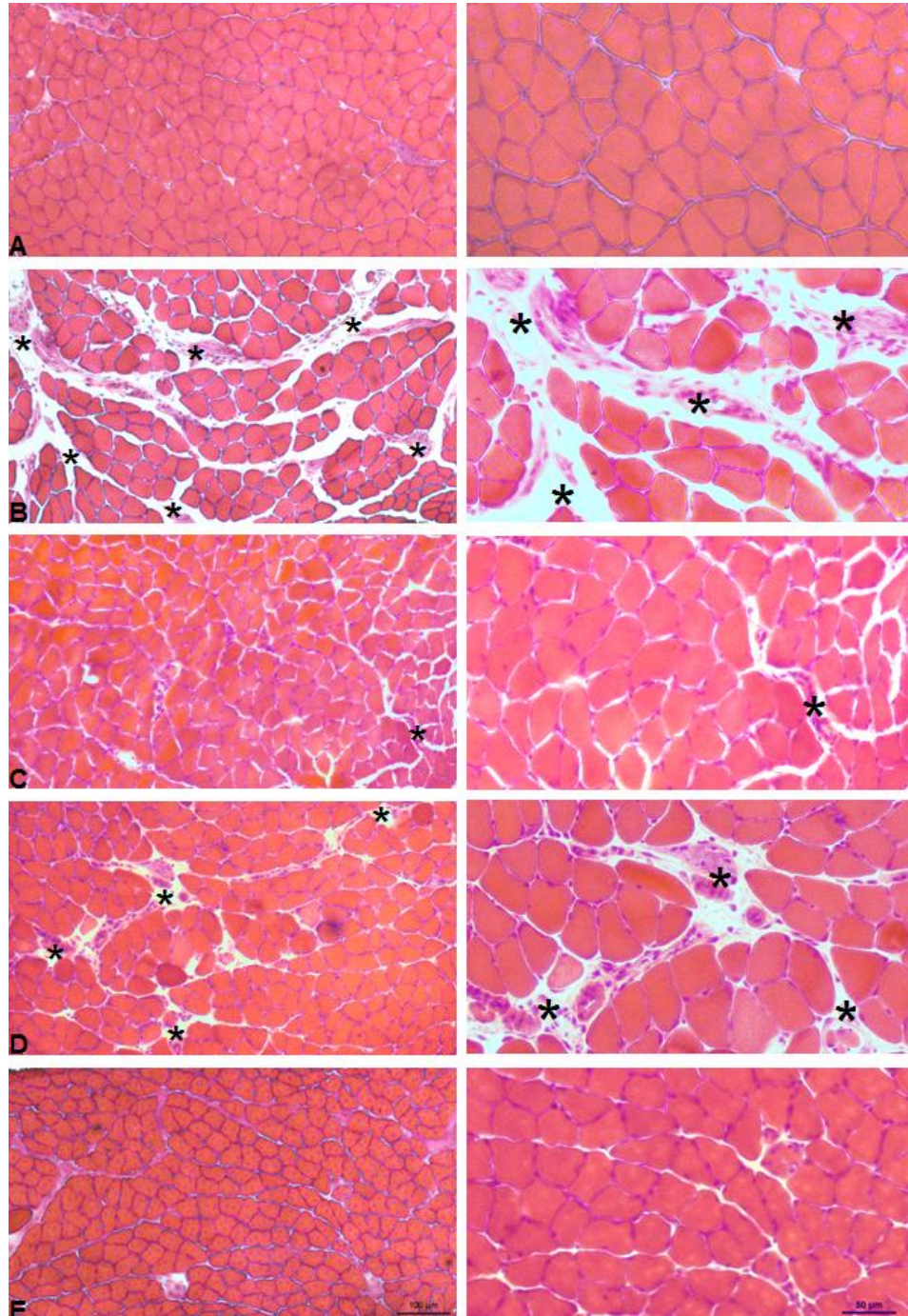


Figura 5: Fotomicrografias representativas de seções transversais de músculos sóleos de camundongos jovens. (A) músculo sóleo controle; (B) músculo sóleo analisado em 24 h após uma sessão de exercício excêntrico; (C) músculo sóleo analisado em 24 h após duas sessões de exercício excêntrico; (D) músculo sóleo analisado em 3 dias após uma sessão de exercício excêntrico; (E) músculo sóleo analisado em 3 dias após duas sessões de exercício excêntrico. Barras 100 µm (fotomicrografias da 1ª coluna) e 50 µm (fotomicrografias da 2ª coluna). Coloração de HE. Os asteriscos indicam espaço intersticial.

Área de interstício

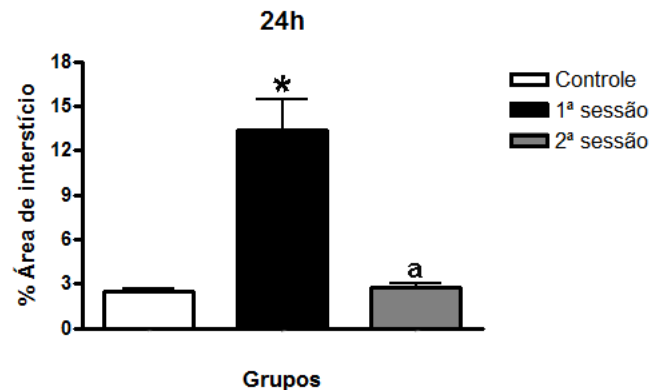


Figura 6. Porcentagem da área de interstício de músculos sóleos analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=4), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=6) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=5). Média da área de secção transversal do músculo por grupo: $1,2 \times 10^6$, $1,1 \times 10^6$ e $1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$, respectivamente. * $p < 0,001$ versus controle; ^a $p < 0,001$ versus 1ª sessão - 24 h.

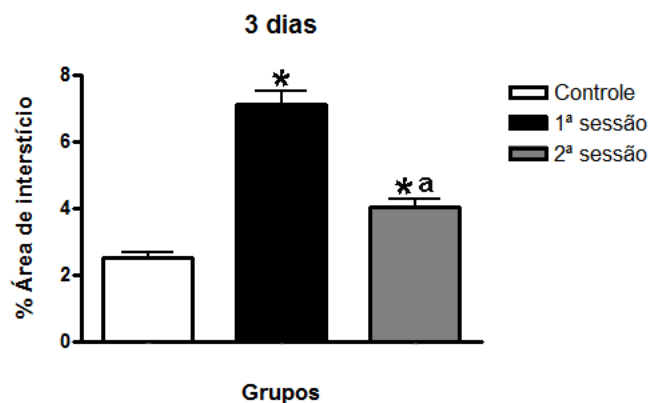


Figura 7. Porcentagem da área de interstício de músculos sóleos analisados 3 dias após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=4), barra preta (1ª sessão – 3 dias, n=3) e barra cinza (2ª sessão – 3 dias, n=3). Média da área de secção transversal do músculo por grupo: $1,2 \times 10^6$, $1,2 \times 10^6$ e $1,1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$, respectivamente. * $p < 0,05$ versus controle; ^a $p < 0,001$ versus 1ª sessão – 3 dias.

Quanto à marcação com EBD, o tecido muscular esquelético apresentou fibras musculares marcadas em vermelho, caracterizadas pelo rompimento do sarcolema e consequente extravasamento do corante para o meio intracelular das células musculares, ratificando que o nosso protocolo é lesivo (Figura 8B). Cortes histológicos seriados corados com HE corroboram a destruição das fibras musculares após a 1ª sessão (Figura 8E). Em 24 h após a 2ª sessão de exercício

houve uma redução de 95,1% no número de fibras lesadas quando comparado ao grupo submetido à apenas uma sessão (Figura 9).

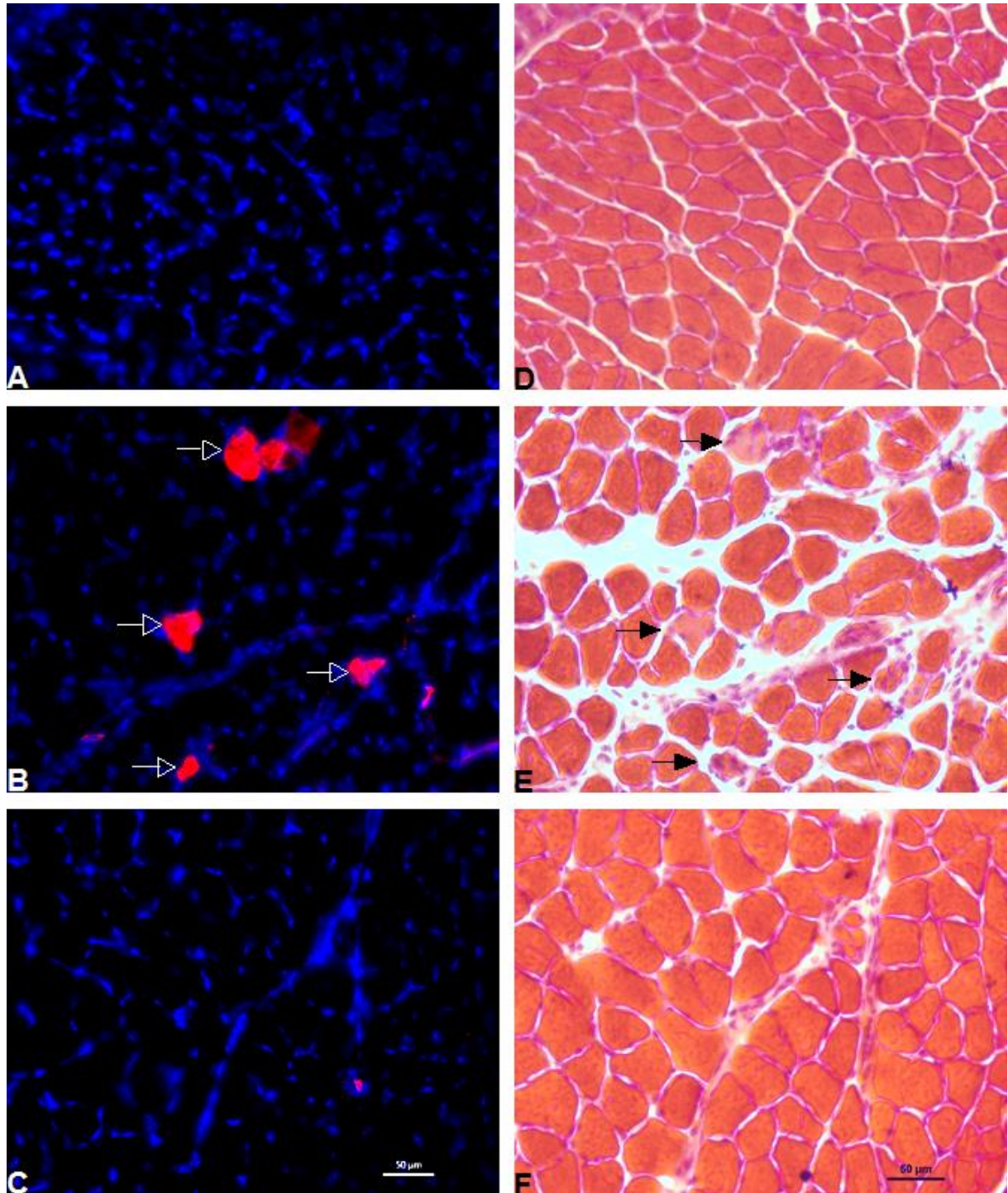


Figura 8: Fibras musculares lesadas marcadas com EBD, em vermelho (A-C); coloração de HE (D-F). Secções transversais de músculo sóleo controle (A e D); músculo sóleo analisado em 24 h após uma sessão de exercício excêntrico (B e E); músculo sóleo analisado em 24 h após duas sessões de exercício excêntrico (C e F). Barra 50 µm (fotomicrografias da 1ª e da 2ª coluna). As setas indicam fibras lesadas.

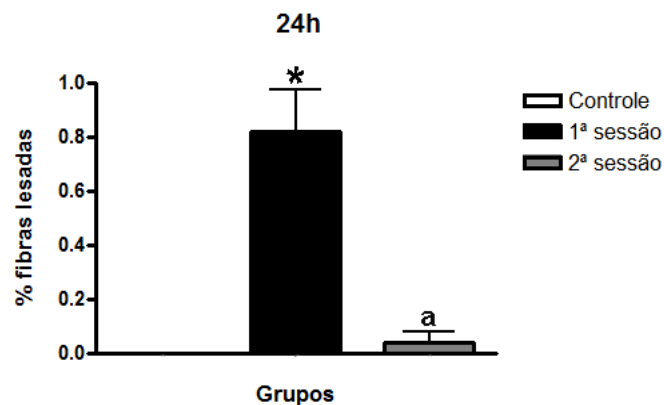


Figura 9: Porcentagem de fibras musculares lesadas de músculos sóleos analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=4), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=5) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=3). Média do total de fibras por músculo = 805. *p<0,01 versus controle; ^ap<0,01 versus 1ª sessão – 24h.

4.3 Expressão gênica

4.3.1 Expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias

TNF- α

Nossos resultados revelaram um aumento da expressão gênica de TNF- α em 24 h após a 1ª sessão (3,1 vezes), com redução aos níveis do grupo controle após a 2ª sessão (Figura 10).

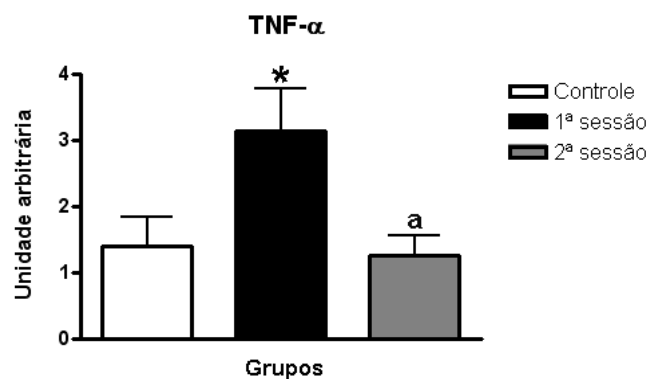


Figura 10. Expressão gênica de TNF- α em músculos sóleos controle ou analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=8), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=6) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=8). *p<0,05 versus controle; ^ap<0,05 versus 1ª sessão – 24 h.

iNOS

Em 24 h após a 1ª sessão de exercício excêntrico, a expressão gênica de iNOS foi elevada em 7,3 vezes, retornando aos níveis basais após a 2ª sessão (Figura 11).

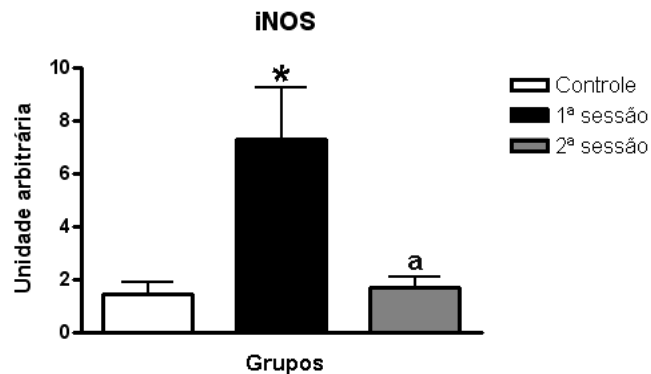


Figura 11. Expressão gênica de iNOS em músculos sóleos controle ou analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=7), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=7) e barra cinza (2ª sessão – 24h, n=9). *p<0,01 versus controle; ^ap<0,01 versus 1ª sessão – 24 h.

IL-1β

Observamos uma elevação da expressão gênica de IL-1β em 24 h após a 1ª sessão (37,5 vezes), e diminuição aos níveis do grupo controle em 24 h após a 2ª sessão de exercício excêntrico (Figura 12).

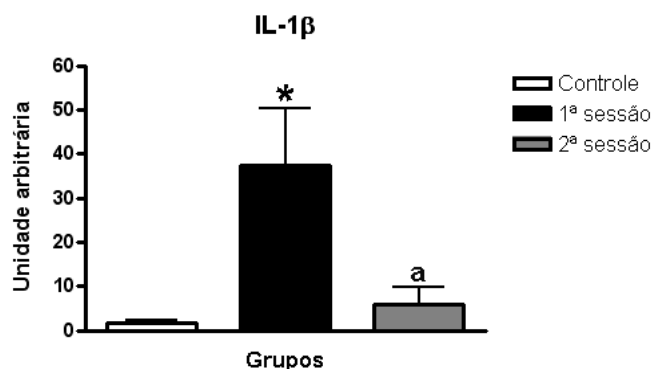


Figura 12. Expressão gênica de IL-1β em músculos sóleos controle ou analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=7), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=8) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=8). *p<0,05 versus controle; ^ap<0,05 versus 1ª sessão – 24 h.

MCP-1

A expressão gênica da citocina MCP-1 aumentou consideravelmente em 24 h após a 1ª sessão de exercício excêntrico (133,2 vezes). No entanto, não houve alteração da expressão gênica desta citocina no grupo submetido à 2ª sessão, quando comparado ao grupo controle (Figura 13).

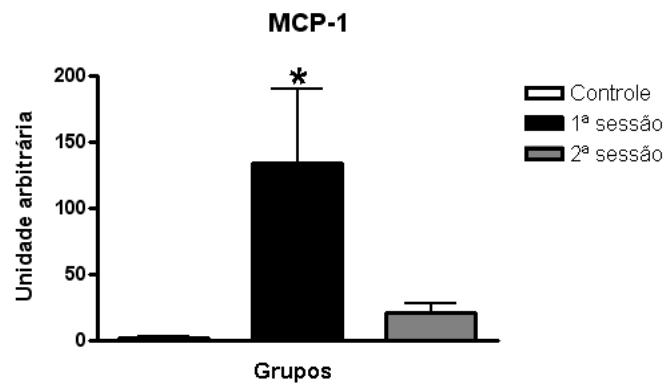


Figura 13. Expressão gênica de MCP-1 em músculos sóleos controle ou analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=9), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=10) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=9). * $p < 0,05$ versus controle.

4.3.2 Expressão gênica de citocinas anti-inflamatórias

IL-10

A expressão gênica de IL-10 foi indetectável no grupo controle, porém foi observada nos grupos 1ª e 2ª sessão, sendo que essa expressão foi menor após a 2ª sessão quando comparada à 1ª (64,6%) (Figura 14).

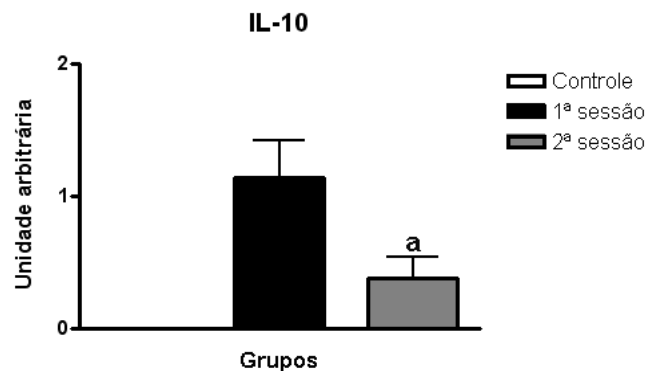


Figura 14. Expressão gênica de IL-10 em músculos sóleos analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste *t-student* para verificar diferença entre os grupos: barra preta (1ª sessão – 24 h, n=5) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=5). ^a $p < 0,05$ versus 1ª sessão – 24 h.

YM1

A expressão gênica de YM1 não foi observada no grupo controle, porém foi elevada no grupo submetido à 1ª sessão com expressiva redução no grupo submetido à 2ª sessão (91,9%) (Figura 15).

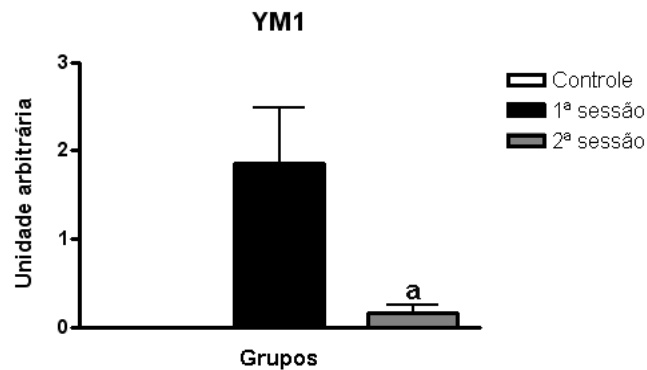


Figura 15. Expressão gênica de YM1 em músculos sóleos analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste *t-student* para verificar diferença entre os grupos: barra preta (1ª sessão – 24 h, n=6) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=9). ^ap<0,05 versus 1ª sessão – 24 h.

Fizz-1

A expressão gênica de Fizz-1 foi elevada em 24h após a 1ª sessão (3,6 vezes), retornando aos valores basais após a 2ª sessão (Figura 16).

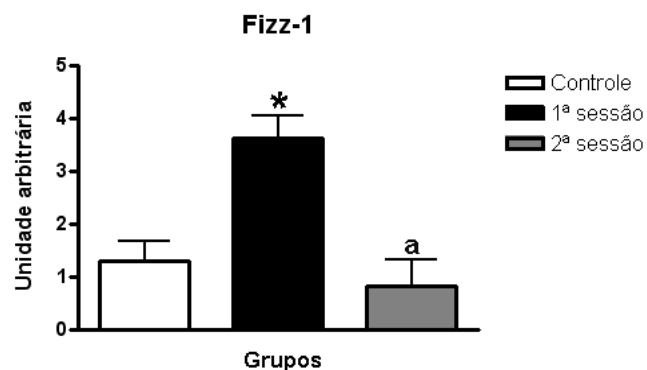


Figura 16. Expressão gênica de Fizz-1 em músculos sóleos controle ou analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=7), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=7) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=9). *p<0,01 versus controle; ^ap<0,001 versus 1ª sessão – 24 h.

Arginase-1

A expressão gênica da Arg-1 foi robustamente elevada em 24 h após a 1ª sessão (58 vezes), atingindo os níveis do grupo controle após a 2ª sessão de exercício excêntrico (Figura 17).

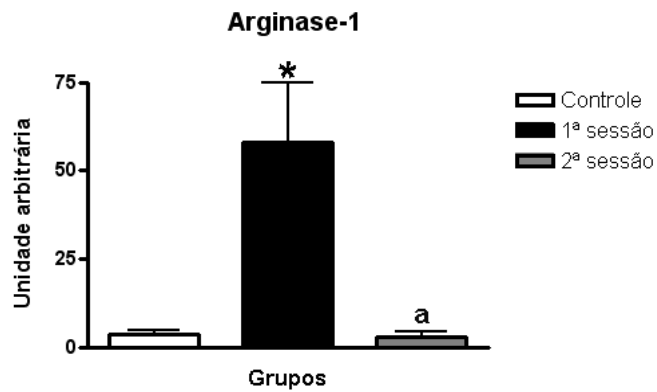


Figura 17. Expressão gênica de Arginase-1 em músculos sóleos controle ou analisados 24 h após a 1ª ou a 2ª sessão de exercício excêntrico. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimentos por múltiplas comparações foram aplicados para verificar diferença entre os grupos: barra branca (controle, n=7), barra preta (1ª sessão – 24 h, n=7) e barra cinza (2ª sessão – 24 h, n=9). * $p < 0,01$ vs controle; ^a $p < 0,001$ vs 1ª sessão – 24 h.

5 DISCUSSÃO

Durante as contrações excêntricas, o mecanismo de controle de força e a mecânica da ação muscular são distintos daqueles envolvidos nas contrações musculares isométricas e concêntricas, sendo as fibras musculares estiradas e tensionadas ao mesmo tempo (Barroso et al., 2005). Essa maior tensão pode provocar danos ao músculo esquelético, rompendo o sarcolema das fibras musculares e permitindo a entrada de Ca^{2+} para o meio intracelular com subsequente proteólise (Ciciliot, Schiaffino, 2010; Grefte et al., 2007). Após a lesão, é comum o surgimento de sintomas como edema, dor, perda de força muscular e aumento na atividade de creatina quinase (CK) plasmática (Kamandulis et al., 2010; Sakurai et al., 2013; Yanagisawa et al., 2010). Não obstante, após uma segunda sessão de exercício excêntrico, o músculo parece sofrer uma adaptação, o ECR, apresentando uma atenuação da lesão, da perda de força e da dor (Chen et al., 2012; Paulsen et al., 2009).

De acordo com a literatura (Armstrong et al., 1983; Ogilvie et al., 1988; Shen et al., 2013; Touchberry et al., 2012), nosso protocolo se mostrou efetivo em provocar injúria no músculo esquelético. Através do nosso protocolo de exercício excêntrico executado em esteira, com declive, observamos nas secções transversais dos músculos SOL fibras musculares lesadas marcadas com EBD, em 24 h após a 1ª sessão de exercício excêntrico. Similarmente aos trabalhos anteriores, em 24 h após a 2ª sessão verificamos o ECR, demonstrado por meio da redução significativa no número de fibras lesadas.

O ECR tem sido explorado em estudos com animais e humanos (McHugh, 2003; Nosaka, Sakamoto, 2001; Nosaka et al., 2001; Paulsen et al., 2009; Touchberry et al., 2012; Vissing et al., 2008). Alterações neurais foram propostas como responsáveis por este efeito, visto que as contrações excêntricas apresentam, de antemão, distintas características neurais em relação às contrações concêntrica e isométrica, com menor amplitude do sinal EMG para uma mesma força, ou seja, menor ativação elétrica (Enoka, 1996).

Adaptações mecânicas também podem estar envolvidas nesta proteção promovida pelo ECR. O aumento da rigidez muscular foi sugerido como produto de mudanças estruturais nos elementos elásticos (titina e desmina) da musculatura esquelética com papel preventivo frente ao hiperestiramento dos sarcômeros

provocado pelo estresse mecânico durante as contrações excêntricas, com concomitante formação de edema (possíveis modificações no tecido conjuntivo - epimísio e perimísio) (Howell et al., 1985; Purslow, 1989). Apesar de não termos avaliado proteínas musculares estruturais, nossos resultados histológicos mostraram um aumento da área intersticial após a 1ª sessão (possível edema), em ambos os períodos, com posterior atenuação dessa área após a 2ª sessão. Assim, é possível hipotetizar que tais alterações morfológicas possam ter ocorrido devido à modulação dos componentes da matriz extracelular após a carga repetida. Além disso, essas alterações microscópicas não refletiram em modificações nos pesos corporal e muscular.

Como mencionado anteriormente, outro mecanismo que poderia esclarecer o ECR provém de adaptações celulares (McHugh, 2003). Mesmo havendo evidências a respeito do aumento no número de sarcômeros em série e disfunções no sistema A-C (Brockett et al., 2001; Lynn et al., 1998; Warren et al., 2001), a resposta inflamatória nos pareceu mais atrativa e convergiu com os nossos resultados. Afinal, é em resposta à injúria que o processo inflamatório é desencadeado, com a migração de células fagocitárias e secretoras de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento para o local da lesão, as quais contribuem para o processo regenerativo do tecido muscular esquelético (Arnold et al., 2007; Ciciliot, Schiaffino, 2010; Grefte et al., 2007; Jarvinen et al., 2005).

Com enfoque em citocinas, Liao et al. (2010) observaram, em ratas, um pico de expressão gênica de TNF-alfa em 24 h após o exercício excêntrico em esteira (duração de 2 h), tanto no músculo GAS como na porção profunda do músculo vasto lateral (DVL). Minari et al. (2015), complementando o estudo anterior, verificaram um aumento da expressão proteica desta citocina na cabeça longa do tríceps (CLT) de ratos em 24, 48 e 72 h após corrida em esteira (descida). Resultados similares foram encontrados em nossas análises, com um aumento da expressão gênica de TNF- α em 24 h após a 1ª sessão. Considerando que o TNF- α possui importante função durante a inflamação aguda e crônica (Palladino et al., 2003), e que estimula os macrófagos M1, os quais secretam citocinas pró-inflamatórias, especulamos que essa elevação da expressão gênica de TNF- α pode ter contribuído para uma maior expressão de citocinas pró-inflamatórias na tentativa de promover a fagocitose e a digestão de debris.

Em outro estudo, ratos Wistar apresentaram um aumento na expressão gênica de iNOS no músculo TA após serem submetidos a 5 dias consecutivos de exercício excêntrico intermitente em esteira (Shen et al., 2013). Em nosso estudo, também observamos uma elevação da expressão gênica de iNOS em 24 h após a 1ª sessão de exercício excêntrico. Visto que animais *knockout* para esta citocina tiveram déficit na proliferação e diferenciação de células satélites após lesão com CTX (Rigamonti et al., 2013), sugerimos que esse aumento da expressão gênica de iNOS pode ter otimizado o processo de regeneração muscular, estimulando a proliferação e diferenciação de células precursoras miogênicas de modo a recompor as fibras lesadas após o exercício excêntrico.

Níveis elevados de expressão proteica de IL-1 β foram encontrados nos músculos GAS de ratos Wistar após cinco sessões de EEs excêntricas (Ochi et al., 2011), assim como em músculo QD de ratos submetidos ao exercício excêntrico em esteira, após 24 h (Silva, Tromm et al., 2013). Hamada et al. (2005) mostraram um aumento da expressão gênica de IL-1 β em músculo vasto lateral (VL) de humanos idosos (entre 66 e 78 anos) após 72h de exercício excêntrico em esteira, com aparente tendência de aumento em sujeitos jovens. Nossos dados mostraram uma substancial elevação da expressão gênica de IL-1 β em 24 h após a 1ª sessão. A citocina IL-1 β está envolvida na modulação de células imunes durante a fagocitose (Burdzinska et al., 2014) e a sua expressão estimula o NF κ B, o qual ativa a transcrição de genes envolvidos com inflamação (Ghosh, Hayden, 2008). Assim, é possível hipotetizar que essa alta expressão gênica de IL-1 β , assim como a do TNF- α , pode ter auxiliado na regulação de células inflamatórias e consequente acúmulo de citocinas pró-inflamatórias no local da lesão, otimizando os períodos iniciais do processo de regeneração muscular esquelético.

Haramizu et al. (2011) verificaram que camundongos resistentes e predispostos à senescência tiveram um aumento na expressão gênica de MCP-1 no músculo GAS após serem submetidos ao exercício excêntrico em esteira. Camundongos *knockout* para esta citocina tiveram a indução de TNF- α e a ativação de NF- κ B comprometidas e a fibrose diminuída em resposta a um corpo estranho (Moore et al., 2015). Em nossos experimentos, a expressão gênica da citocina MCP-1 aumentou robustamente em 24 h após a 1ª sessão de exercício excêntrico, com aparente tendência de redução após a 2ª sessão. A citocina MCP-1 pode comprometer a angiogênese e a regeneração muscular esquelética (Moore et al.,

2015), e a ausência desta citocina em animais transgênicos (*knockout*) diminuiu o recrutamento de macrófagos após a lesão muscular com CTX (Martinez et al., 2010). Portanto, propomos que o grande aumento da expressão gênica de MCP-1 pode ter estimulado o acúmulo de células do sistema imune no local da lesão suficiente para promover um microambiente mais propício para a recuperação do tecido muscular esquelético.

Em estágios tardios da inflamação, os macrófagos M2 secretam IL-10 e Fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-1), os quais auxiliam na regeneração da fibra muscular lesada (Rigamonti et al., 2013). Smith et al. (2007) detectaram, em humanos, um aumento da concentração plasmática de IL-10 em 12 h após a 2ª sessão de exercício excêntrico em esteira. A citocina IL-10 atua como supressora de citocinas pró-inflamatórias via STAT3 (*“Signal transducer and activator of transcription factor 3”*) (MacKenzie et al., 2014). Assim, sugerimos que o aumento da expressão gênica de IL-10 ocorrido em nosso estudo após a 1ª sessão tenha sido proporcionado no intuito de conter a produção de citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α , iNOS, IL-1 β e MCP-1), e sua posterior queda frente ao dano repetido tenha acontecido como consequência da menor extensão da lesão.

Nair et al. (2003) mostraram um aumento na indução da expressão gênica de Fizz1 e YM1 em macrófagos isolados de camundongos tratados com IL-4, assim como macrófagos derivados da medula óssea apresentaram altos níveis de expressão proteica de YM1 e Arg-1 após o tratamento com IL-4 e IL-13 (Welch et al., 2002), sugerindo a interação entre estas citocinas e macrófagos. No presente estudo, a expressão gênica de YM1 não foi observada no grupo controle, sendo expressa no grupo 1ª sessão com notável redução após a 2ª sessão. Considerando que a citocina YM1 é altamente expressa em ratos com inflamação pulmonar (Zhong et al., 2014) e está envolvida na indução de macrófagos M2 (Dasgupta et al., 2011), sugerimos que o aumento na expressão gênica de YM1 obtido em 24 h após a 1ª sessão de exercício excêntrico pode ter contribuído para a sinalização de macrófagos anti-inflamatórios para o local da lesão, de modo a atenuar o processo inflamatório.

Como anteriormente exposto, a citocina Fizz-1 é induzida por citocinas Th2 funcionando como supressora da inflamação e fibrose em tecido pulmonar e hepático (Holcomb et al., 2000; Pesce, Ramalingam, Wilson et al., 2009). Nossos dados mostraram que a expressão gênica de Fizz-1 aumentou em 24 h após a 1ª

sessão, e retornou aos níveis do controle após o dano repetido. Ainda que em tecido distinto (pulmão), a literatura relata elevados níveis de expressão gênica das isoformas de Fizz-1/2 em processos inflamatórios (Stutz et al., 2003), o que torna possível hipotetizar que o aumento na expressão gênica de Fizz-1 verificado em nosso estudo em 24 h após a 1ª sessão de exercício excêntrico pode ter acontecido na tentativa de controlar a inflamação e prevenir o possível surgimento de fibrose muscular durante a regeneração muscular esquelética.

A citocina Arg-1 está envolvida no metabolismo da arginina, a qual contribui de forma significativa para o desenvolvimento da fibrose muscular em camundongos com DMD (Wehling-Henricks et al., 2010). Além disso, assim como a citocina YM1, tem sua expressão gênica elevada em ratos com inflamação pulmonar (Zhong et al., 2014). Nossas análises revelaram que a expressão gênica de Arg-1 foi robustamente elevada em 24 h após a 1ª sessão, atingindo os níveis do grupo controle após a 2ª sessão de exercício excêntrico. Este aumento robusto após a 1ª sessão possivelmente pode ter colaborado para a deposição de colágeno e remodelamento da matriz extracelular após a lesão, atuando em conjunto com as citocinas IL-10, YM1 e Fizz-1.

Citamos anteriormente que os estudos com exercício excêntrico realizados em animais geralmente utilizam corrida em esteiras motorizadas, com declive, para induzir o dano. A maioria desses protocolos apresenta variações quanto à velocidade (10 a 26 m/min) (Armstrong, Taylor, 1993; Maruhashi et al., 2007), inclinação (-5 a -30°) (Chavanelle et al., 2014; Hollander et al., 2001) e tempo de duração (30 a 150 min) (Kawanishi et al., 2013; Valero et al., 2012). Apesar da variabilidade dos parâmetros, é consensual que o objetivo de se provocar o dano é atingido, ainda que o mesmo seja mensurado, em muitos estudos, de maneira indireta (aumento da concentração plasmática de CK e da expressão de HSPs).

Outro fator importante a ser levado em consideração nesses protocolos utilizando esteiras é o tempo de duração destes; o que se relaciona com questões sobre a influência do exercício aeróbio nos resultados obtidos, visto que grande parte deles executam, no mínimo, 30 min de corrida. Todavia, deve-se ressaltar que o exercício aeróbio é caracterizado pelo consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) e depleção preferencial de carboidratos (glicogênio) em sujeitos destreinados. Um trabalho recente comparando o VO_2 de ratos Wistar em subida (predominantemente concêntrica) e descida (predominantemente excêntrica) mostrou que para uma

mesma angulação, os animais submetidos ao exercício excêntrico apresentaram quase metade do VO_2 daqueles que correram em concêntrica (Chavanelle et al., 2014). Armstrong, Taylor (1993) avaliaram em ratos a perda de glicogênio em três angulações ($+16^\circ$, 0° e -16°), e apenas após o exercício excêntrico o glicogênio muscular foi mantido.

Um trabalho observou um aumento da concentração plasmática de CK, redução da capacidade de absorção de radicais livres (atividade antioxidante) e aumento de leucócitos apoptóticos em 24 h somente após corrida em descida (esteira) quando comparados à corrida em horizontal (Park, Lee, 2015). Buford et al. (2009) mostraram, em humanos, que em 3 e 24 h após uma sessão de exercício excêntrico aeróbio (-10° , 45 min e 60% do VO_{2max}) não houve aumento significativo na expressão gênica de TNF- α e IL-1 β no músculo VL. Assim como, não foram detectadas alterações plasmáticas de TNF- α , IL-1 β e IL-10 em humanos destreinados submetidos às contrações excêntricas (Kanda et al., 2013). Tais achados sugerem que os efeitos aeróbios em protocolos excêntricos com esteira sejam sutis ou nulos.

Proposições recentes tem dado ênfase às vesículas subsarcolemais, atribuindo às mesmas funções críticas na proteção gerada pelo ECR. Durante as contrações excêntricas, os túbulos-T ancorados aos sarcômeros sofreriam pequenas rupturas e, neste momento, vesículas de disferlina localizadas próximas à região subsarcolemal se fundiriam à membrana lesada recompondo a sua estrutura (Ciciliot, Schiaffino, 2010; Cooper, Head, 2014). Yin et al. (2015) mostraram que biópsias de pacientes com disferlinopatia apresentaram maior população de macrófagos quando comparadas às de pacientes com DMD. Esses resultados incipientes nos levam a hipotetizar que a disferlina poderia atuar na modulação do processo inflamatório e, sincronicamente aos nossos resultados, reforçam as evidências de que a proteção muscular decorrente do ECR parece ser mediada pela resposta inflamatória.

6 CONCLUSÃO

Considerando que as citocinas pró e anti-inflamatórias possuem importantes funções na resposta imune e recuperação de tecidos lesados, nossos resultados sugerem que a elevação dos níveis de expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias contribuiu para a atenuação da lesão muscular detectada após a repetição de uma sessão de exercício excêntrico.

REFERÊNCIAS*

- Acharyya S, Villalta SA, Bakkar N, Bupha-Intr T, Janssen PM, Carathers M, Li ZW, Beg AA, Ghosh S, Sahenk Z, Weinstein M, Gardner KL, Rafael-Fortney JA, Karin M, Tidball JG, Baldwin AS, Guttridge DC. Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest.* 2007 Apr;117(4):889-901.
- Allen DG. Eccentric muscle damage: mechanisms of early reduction of force. *Acta Physiol Scand.* 2001 Mar;171(3):311-9.
- Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1983 Jan;54(1):80-93.
- Armstrong RB, Taylor CR. Glycogen loss in rat muscles during locomotion on different inclines. *J Exp Biol.* 1993 Mar;176:135-44.
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007 May 14;204(5):1057-69.
- Balnavae CD, Davey DF, Allen DG. Distribution of sarcomere length and intracellular calcium in mouse skeletal muscle following stretch-induced injury. *J Physiol.* 1997 Aug 1;502 (Pt 3):649-59.
- Barash IA, Peters D, Friden J, Lutz GJ, Lieber RL. Desmin cytoskeletal modifications after a bout of eccentric exercise in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002 Oct;283(4):R958-63.
- Barroso R, Tricoli V, Ugrinowitsch C. Adaptações neurais e morfológicas ao treinamento de força com ações excêntricas. *R bras Ci e Mov.* 2005 Mar;13(2):111-22.
- Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:19-37.
- Brockett CL, Morgan DL, Proske U. Human hamstring muscles adapt to eccentric exercise by changing optimum length. *Med Sci Sports Exerc.* 2001 May;33(5):783-90.
- Brown SJ, Child RB, Day SH, Donnelly AE. Exercise-induced skeletal muscle damage and adaptation following repeated bouts of eccentric muscle contractions. *J Sports Sci.* 1997 Apr;15(2):215-22.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Buford TW, Cooke MB, Shelmadine BD, Hudson GM, Redd L, Willoughby DS. Effects of eccentric treadmill exercise on inflammatory gene expression in human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009 Aug;34(4):745-53.

Burdzinska A, Gala K, Kowalewski C, Zagozdzon R, Gajewski Z, Paczek L. Dynamics of Acute Local Inflammatory Response after Autologous Transplantation of Muscle-Derived Cells into the Skeletal Muscle. *Mediat Inflamm*. 2014.

Chavanelle V, Sirvent P, Ennequin G, Caillaud K, Montaurier C, Morio B, Boisseau N, Richard R. Comparison of oxygen consumption in rats during uphill (concentric) and downhill (eccentric) treadmill exercise tests. *J Sports Sci Med*. 2014 Sep;13(3):689-94.

Chen TCC, Chen HL, Pearce AJ, Nosaka K. Attenuation of Eccentric Exercise-Induced Muscle Damage by Preconditioning Exercises. *Med Sci Sport Exer*. 2012 Nov;44(11):2090-8.

Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of Mammalian Skeletal Muscle: Basic Mechanisms and Clinical Implications. *Curr Pharm Design*. 2010 Mar;16(8):906-14.

Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: An intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Bi*. 2002;18:637-706.

Clarkson PM, Tremblay I. Exercise-Induced Muscle Damage, Repair, and Adaptation in Humans. *J Appl Physiol*. 1988 Jul;65(1):1-6.

Cooper ST, Head SI. Membrane Injury and Repair in the Muscular Dystrophies. *Neuroscientist*. 2014 Nov 18.

D'Antona G, Lanfranconi F, Pellegrino MA, Brocca L, Adami R, Rossi R, Moro G, Miotti D, Canepari M, Bottinelli R. Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibres in male body builders. *J Physiol*. 2006 Feb 1;570(Pt 3):611-27.

Dasgupta P, Chapoval SP, Smith EP, Keegan AD. Transfer of in vivo primed transgenic T cells supports allergic lung inflammation and FIZZ1 and Ym1 production in an IL-4Ralpha and STAT6 dependent manner. *BMC Immunol*. 2011;12:60.

Dedkov EI, Borisov AB, Wernig A, Carlson BM. Aging of skeletal muscle does not affect the response of satellite cells to denervation. *J Histochem Cytochem*. 2003 Jul;51(7):853-63.

Diaz EC, Herndon DN, Porter C, Sidossis LS, Suman OE, Borsheim E. Effects of pharmacological interventions on muscle protein synthesis and breakdown in recovery from burns. *Burns*. 2015 Jun;41(4):649-57.

Donati C, Cencetti F, Bruni P. Sphingosine 1-phosphate axis: a new leader actor in skeletal muscle biology. *Front Physiol*. 2013;4.

Edman KA. Contractile properties of mouse single muscle fibers, a comparison with amphibian muscle fibers. *J Exp Biol.* 2005 May;208(Pt 10):1905-13.

Enoka RM. Eccentric contractions require unique activation strategies by the nervous system. *J Appl Physiol.* 1996 Dec;81(6):2339-46.

Enoka RM. *Neuromechanics of human movement.* Champaign, IL: Human Kinetics; 2002. 556 p.

Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Nov;8(11):837-48.

Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW. Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev.* 2007 Oct;16(5):857-68.

Hamada K, Vannier E, Satchek JM, Witsell AL, Roubenoff R. Senescence of human skeletal muscle impairs the local inflammatory cytokine response to acute eccentric exercise *FASEB J* 2005 Feb;19(2):264-6.

Hamer PW, McGeachie JM, Davies MJ, Grounds MD. Evans Blue Dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *J Anat.* 2002 Jan;200(1):69-79.

Haramizu S, Ota N, Hase T, Murase T. Catechins attenuate eccentric exercise-induced inflammation and loss of force production in muscle in senescence-accelerated mice. *J Appl Physiol (1985).* 2011 Dec;111(6):1654-63.

Harridge SD. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. *Exp Physiol.* 2007 Sep;92(5):783-97.

Hody S, Lacrosse Z, Leprince P, Collodoro M, Croisier JL, Rogister B. Effects of eccentrically and concentrically biased training on mouse muscle phenotype. *Med Sci Sports Exerc.* 2013 Aug;45(8):1460-8.

Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ, Frantz GD, Tumas DB, Peale FV, Jr., Shelton DL, Hebert CC. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J.* 2000 Aug 1;19(15):4046-55.

Hollander J, Fiebig R, Gore M, Ookawara T, Ohno H, Ji LL. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflug Arch Eur J Phy.* 2001 Jun;442(3):426-34.

Hong P, Chen K, Huang BH, Liu M, Cui M, Rozenberg I, Chaqour B, Pan XY, Barton ER, Jiang XC, Siddiqui MAQ. HEXIM1 controls satellite cell expansion after injury to regulate skeletal muscle regeneration. *Journal of Clinical Investigation.* 2012 Nov;122(11):3873-87.

Howell JN, Chila AG, Ford G, David D, Gates T. An Electromyographic Study of Elbow Motion during Postexercise Muscle Soreness. *J Appl Physiol.* 1985;58(5):1713-8.

Hubal MJ, Chen TC, Thompson PD, Clarkson PM. Inflammatory gene changes associated with the repeated-bout effect. *Am J Physiol-Reg I.* 2008 May;294(5):R1628-R37.

Ichikawa T, Li JQ, Nagarkatti P, Nagarkatti M, Hofseth LJ, Windust A, Cui TX. American ginseng preferentially suppresses STAT/iNOS signaling in activated macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2009 Aug 17;125(1):145-50.

Isanejad A, Saraf ZH, Mahdavi M, Gharakhanlou R, Shamsi MM, Paulsen G. The effect of endurance training and downhill running on the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha and HSP72 in rat skeletal muscle. *Cytokine.* 2015 Jun;73(2):302-8.

Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Oct;287(4):C834-43.

Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005 May;33(5):745-64.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia Básica.* 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 556 p.

Kamandulis S, Skurvydas A, Brazaitis M, Skikas L, Duchateau J. The repeated bout effect of eccentric exercise is not associated with changes in voluntary activation. *Eur J Appl Physiol.* 2010 Apr;108(6):1065-74.

Kanda K, Sugama K, Hayashida H, Sakuma J, Kawakami Y, Miura S, Yoshioka H, Mori Y, Suzuki K. Eccentric exercise-induced delayed-onset muscle soreness and changes in markers of muscle damage and inflammation. *Exerc Immunol Rev.* 2013;19:72-85.

Karagounis LG, Hawley JA. Skeletal muscle: increasing the size of the locomotor cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Sep;42(9):1376-9.

Kawanishi N, Kato K, Takahashi M, Mizokami T, Otsuka Y, Imaizumi A, Shiva D, Yano H, Suzuki K. Curcumin attenuates oxidative stress following downhill running-induced muscle damage. *Biochem Bioph Res Co.* 2013 Nov 22;441(3):573-8.

Keynes RD, Aidley DJ. *Nerve and muscle.* 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2001. 179 p.

Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL, Munoz-Canoves P. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:491497.

Lapointe BM, Fremont P, Cote CH. Adaptation to lengthening contractions is independent of voluntary muscle recruitment but relies on inflammation. *Am J Physiol-Reg I*. 2002 Jan;282(1):R323-R9.

Lehti TM, Kalliokoski R, Komulainen J. Repeated bout effect on the cytoskeletal proteins titin, desmin, and dystrophin in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2007;28(1):39-47.

Liao P, Zhou J, Ji LL, Zhang Y. Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010 Mar;298(3):R599-607.

Lieber RL. *Skeletal muscle structure, function & plasticity : the physiological basis of rehabilitation*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 2002. [300 p.].

Liu N, Nelson BR, Bezprozvannaya S, Shelton JM, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Requirement of MEF2A, C, and D for skeletal muscle regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 18;111(11):4109-14.

Lynn R, Talbot JA, Morgan DL. Differences in rat skeletal muscles after incline and decline running. *J Appl Physiol* (1985). 1998 Jul;85(1):98-104.

MacKenzie KF, Pattison MJ, Arthur JS. Transcriptional regulation of IL-10 and its cell-specific role in vivo. *Crit Rev Immunol*. 2014;34(4):315-45.

MacIntosh BR, Gardiner PF, McComas AJ. *Skeletal muscle: form and function*. 2. ed. Champaign, IL: Human Kinetics; 2006. 423 p.

Mandal P, Pratt BT, Barnes M, McMullen MR, Nagy LE. Molecular mechanism for adiponectin-dependent M2 macrophage polarization: link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin. *J Biol Chem*. 2011 Apr 15;286(15):13460-9.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004 Dec;25(12):677-86.

Margarita R. Positive and negative work performances and their efficiencies in human locomotion. *Int Z Angew Physiol*. 1968 May 28;25(4):339-51.

Martinez CO, McHale MJ, Wells JT, Ochoa O, Michalek JE, McManus LM, Shireman PK. Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2-activating chemokines is directly related to macrophage recruitment. *Am J Physiol-Reg I*. 2010 Sep;299(3):R832-R42.

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci-Landmrk*. 2008 Jan 1;13:453-61.

Martini FH, Timmons MJ, Tallitsch RB. *Anatomia humana*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2009. 870 p.

Maruhashi Y, Kitaoka K, Yoshiki Y, Nakamura R, Okano A, Nakamura K, Tsuyama T, Shima Y, Tomita K. ROS scavenging activity and muscle damage prevention in eccentric exercise in rats. *J Physiol Sci*. 2007 Aug;57(4):211-6.

McHugh MP. Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sports*. 2003 Apr;13(2):88-97.

McHugh MP, Connolly DA, Eston RG, Kremenec IJ, Nicholas SJ, Gleim GW. The role of passive muscle stiffness in symptoms of exercise-induced muscle damage. *Am J Sports Med*. 1999 Sep-Oct;27(5):594-9.

McHugh MP, Connolly DAJ, Eston RG, Gartman EJ, Gleim GW. Electromyographic analysis of repeated bouts of eccentric exercise. *J Sport Sci*. 2001 Mar;19(3):163-70.

Minari ALA, Oyama LM, dos Santos RVT. Downhill Exercise-Induced Changes in Gene Expression Related with Macrophage Polarization and Myogenic Cells in the Triceps Long Head of Rats. *Inflammation*. 2015 Feb;38(1):209-17.

Miyabara EH, Baptista IL, Lomonte B, Selistre-de-Araujo HS, Gutierrez JM, Moriscot AS. Effect of calcineurin inhibitors on myotoxic activity of crotoxin and Bothrops asper phospholipase A2 myotoxins in vivo and in vitro. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2006 Jul;143(3):284-94.

Moore LB, Sawyer AJ, Charokopos A, Skokos EA, Kyriakides TR. Loss of monocyte chemoattractant protein-1 alters macrophage polarization and reduces NFkappaB activation in the foreign body response. *Acta Biomater*. 2015 Jan;11:37-47.

Morgan DL. New Insights into the Behavior of Muscle during Active Lengthening. *Biophys J*. 1990 Feb;57(2):209-21.

Morgan DL, Allen DG. Early events in stretch-induced muscle damage. *J Appl Physiol*. 1999 Dec;87(6):2007-15.

Nair MG, Cochrane DW, Allen JE. Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro. *Immunol Lett*. 2003 Jan 22;85(2):173-80.

Neumann DA. *Cinesiologia do aparelho musculoesquelético: fundamentos para reabilitação*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. 743 p.

Newham DJ, McPhail G, Mills KR, Edwards RH. Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. *J Neurol Sci*. 1983 Sep;61(1):109-22.

Nosaka K, Clarkson PM. Muscle damage following repeated bouts of high force eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 1995 Sep;27(9):1263-9.

Nosaka K, Newton M. Concentric or eccentric training effect on eccentric exercise-induced muscle damage. *Med Sci Sports Exerc*. 2002a Jan;34(1):63-9.

Nosaka K, Newton M. Repeated eccentric exercise bouts do not exacerbate muscle damage and repair. *J Strength Cond Res.* 2002b Feb;16(1):117-22.

Nosaka K, Sakamoto K. Effect of elbow joint angle on the magnitude of muscle damage to the elbow flexors. *Med Sci Sports Exerc.* 2001 Jan;33(1):22-9.

Nosaka K, Sakamoto K, Newton M, Sacco P. How long does the protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last? *Med Sci Sports Exerc.* 2001 Sep;33(9):1490-5.

Ochi E, Nakazato K, Ishii N. Muscular hypertrophy and changes in cytokine production after eccentric training in the rat skeletal muscle. *J Strength Cond Res.* 2011 Aug;25(8):2283-92.

Ogilvie RW, Armstrong RB, Baird KE, Bottoms CL. Lesions in the rat soleus muscle following eccentrically biased exercise. *Am J Anat.* 1988 Aug;182(4):335-46.

Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Sep;2(9):736-46.

Park KS, Lee MG. Effects of unaccustomed downhill running on muscle damage, oxidative stress, and leukocyte apoptosis. *J Exerc Nutrition Biochem.* 2015 Jun;19(2):55-63.

Paulsen G, Lauritzen F, Bayer ML, Kalhovde JM, Ugelstad I, Owe SG, Hallen J, Bergersen LH, Raastad T. Subcellular movement and expression of HSP27, alphaB-crystallin, and HSP70 after two bouts of eccentric exercise in humans. *J Appl Physiol (1985).* 2009 Aug;107(2):570-82.

Penas F, Mirkin GA, Vera M, Cevey A, Gonzalez CD, Gomez MI, Sales ME, Goren NB. Treatment in vitro with PPARalpha and PPARgamma ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from T. cruzi-infected mice. *Biochim Biophys Acta* 2015 May;1852(5):893-904.

Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, Wynn TA. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog.* 2009 Apr;5(4):e1000371.

Pesce JT, Ramalingam TR, Wilson MS, Mentink-Kane MM, Thompson RW, Cheever AW, Urban JF, Jr., Wynn TA. Retnla (relmalpha/fizz1) suppresses helminth-induced Th2-type immunity. *PLoS Pathog.* 2009 Apr;5(4):e1000393.

Peterson JM, Feedback KD, Baas JH, Pizza FX. Tumor necrosis factor-alpha promotes the accumulation of neutrophils and macrophages in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985).* 2006 Nov;101(5):1394-9.

Pette D. Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985).* 2001 Mar;90(3):1119-24.

Powers SK, Howley ET. Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento físico e ao desempenho. Barueri: Manole; 2009.

Proske U, Allen TJ. Damage to skeletal muscle from eccentric exercise. *Exerc Sport Sci Rev.* 2005 Apr;33(2):98-104.

Proske U, Gregory JE, Morgan DL, Percival P, Weerakkody NS, Canny BJ. Force matching errors following eccentric exercise. *Hum Mov Sci.* 2004 Oct;23(3-4):365-78.

Proske U, Morgan DL. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J Physiol.* 2001 Dec 1;537(Pt 2):333-45.

Purslow PP. Strain-induced reorientation of an intramuscular connective tissue network: implications for passive muscle elasticity. *J Biomech.* 1989;22(1):21-31.

Quintana HT, Bortolin JA, da Silva NT, Ribeiro FA, Liberti EA, Ribeiro DA, de Oliveira F. Temporal study following burn injury in young rats is associated with skeletal muscle atrophy, inflammation and altered myogenic regulatory factors. *Inflamm Res.* 2015 Jan;64(1):53-62.

Rao P, Hayden MS, Long M, Scott ML, West AP, Zhang D, Oeckinghaus A, Lynch C, Hoffmann A, Baltimore D, Ghosh S. I κ B β acts to inhibit and activate gene expression during the inflammatory response. *Nature.* 2010 Aug 26;466(7310):1115-9.

Reich TE, Lindstedt SL, LaStayo PC, Pierotti DJ. Is the spring quality of muscle plastic? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000 Jun;278(6):R1661-6.

Rigamonti E, Touvier T, Clementi E, Manfredi AA, Brunelli S, Rovere-Querini P. Requirement of inducible nitric oxide synthase for skeletal muscle regeneration after acute damage. *J Immunol.* 2013 Feb 15;190(4):1767-77.

Roig M, MacIntyre DL, Eng JJ, Narici MV, Maganaris CN, Reid WD. Preservation of eccentric strength in older adults: Evidence, mechanisms and implications for training and rehabilitation. *Exp Gerontol.* 2010 Jun;45(6):400-9.

Sacco P, Jones DA. The protective effect of damaging eccentric exercise against repeated bouts of exercise in the mouse tibialis anterior muscle. *Exp Physiol.* 1992 Sep;77(5):757-60.

Saclier M, Cuvellier S, Magnan M, Mounier R, Chazaud B. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *FEBS J.* 2013 Sep;280(17):4118-30.

Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, Arnold L, Ardjoune H, Magnan M, Sailhan F, Chelly J, Pavlath GK, Mounier R, Kjaer M, Chazaud B. Differentially Activated Macrophages Orchestrate Myogenic Precursor Cell Fate During Human Skeletal Muscle Regeneration. *Stem Cells.* 2013 Feb;31(2):384-96.

Sakurai T, Kashimura O, Kano Y, Ohno H, Ji LL, Izawa T, Best TM. Role of nitric oxide in muscle regeneration following eccentric muscle contractions in rat skeletal muscle. *Journal of Physiological Sciences*. 2013 Jul;63(4):263-70.

Sam M, Shah S, Friden J, Milner DJ, Capetanaki Y, Lieber RL. Desmin knockout muscles generate lower stress and are less vulnerable to injury compared with wild-type muscles. *Am J Physiol-Cell Ph*. 2000 Oct;279(4):C1116-C22.

Sawant DV, Sehra S, Nguyen ET, Jadhav R, Englert K, Shinnakasu R, Hango G, Broxmeyer HE, Nakayama T, Perumal NB, Kaplan MH, Dent AL. Bcl6 controls the Th2 inflammatory activity of regulatory T cells by repressing Gata3 function. *J Immunol*. 2012 Nov 15;189(10):4759-69.

Schiaffino S, Partridge T. *Skeletal muscle repair and regeneration*. New York: Springer; 2008.

Shen YC, Yen JC, Liou KT. Ameliorative effects of caffeic acid phenethyl ester on an eccentric exercise-induced skeletal muscle injury by down-regulating NF-kappaB mediated inflammation. *Pharmacology*. 2013;91(3-4):219-28.

Shireman PK, Contreras-Shannon V, Ochoa O, Karia BP, Michalek JE, McManus LM. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *J Leukoc Biol*. 2007 Mar;81(3):775-85.

Silva LA, Bom KF, Tromm CB, Rosa GL, Mariano I, Pozzi BG, Tuon T, Stresck EL, Souza CT, Pinho RA. Effect of eccentric training on mitochondrial function and oxidative stress in the skeletal muscle of rats. *Braz J Med Biol Res*. 2013 Jan;46(1):14-20.

Silva LA, Tromm CB, Da Rosa G, Bom K, Luciano TF, Tuon T, De Souza CT, Pinho RA. Creatine supplementation does not decrease oxidative stress and inflammation in skeletal muscle after eccentric exercise. *J Sports Sci*. 2013;31(11):1164-76.

Silva LH, Silva MT, Gutierrez RM, Conte TC, Toledo CA, Aoki MS, Liebano RE, Miyabara EH. GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. *Laser Med Sci*. 2012 Sep;27(5):993-1000.

Silva, RB. *Respostas musculares à realização de ações excêntricas em diferentes velocidades e sua influência no efeito da carga repetida*. Teses e Dissertações da USP. 2007 Ago;54.

Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, Hainzl A, Schatz S, Qi Y, Schlecht A, Weiss JM, Wlaschek M, Sunderkotter C, Scharffetter-Kochanek K. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest*. 2011 Mar;121(3):985-97.

Smith LL, McKune AJ, Semple SJ, Sibanda E, Steel H, Anderson R. Changes in serum cytokines after repeated bouts of downhill running. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007 Apr;32(2):233-40.

Stutz AM, Pickart LA, Trifilieff A, Baumruker T, Prieschl-Strassmayr E, Woisetschlager M. The Th2 cell cytokines IL-4 and IL-13 regulate found in inflammatory zone 1/resistin-like molecule alpha gene expression by a STAT6 and CCAAT/enhancer-binding protein-dependent mechanism. *J Immunol* 2003 Feb; 170(4):1789-96.

Tajsharghi H. Thick and thin filament gene mutations in striated muscle diseases. *Int J Mol Sci*. 2008 Jul;9(7):1259-75.

Tiidus PM. Skeletal muscle damage and repair. Leeds: Human Kinetics; 2008.

Touchberry CD, Gupte AA, Bomhoff GL, Graham ZA, Geiger PC, Gallagher PM. Acute heat stress prior to downhill running may enhance skeletal muscle remodeling. *Cell Stress Chaperon*. 2012 Nov;17(6):693-705.

Valero MC, Huntsman HD, Liu JM, Zou K, Boppart MD. Eccentric Exercise Facilitates Mesenchymal Stem Cell Appearance in Skeletal Muscle. *Plos One*. 2012 Jan 11;7(1).

Vijayan K, Thompson JL, Norenberg KM, Fitts RH, Riley DA. Fiber-type susceptibility to eccentric contraction-induced damage of hindlimb-unloaded rat AL muscles. *J Appl Physiol* (1985). 2001 Mar;90(3):770-6.

Villalta SA, Deng B, Rinaldi C, Wehling-Henricks M, Tidball JG. IFN-gamma promotes muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by suppressing M2 macrophage activation and inhibiting muscle cell proliferation. *J Immunol*. 2011 Nov 15;187(10):5419-28.

Vissing K, Bayer ML, Overgaard K, Schjerling P, Raastad T. Heat shock protein translocation and expression response is attenuated in response to repeated eccentric exercise. *Acta Physiol*. 2009 Jul;196(3):283-93.

Vissing K, Overgaard K, Nedergaard A, Fredsted A, Schjerling P. Effects of concentric and repeated eccentric exercise on muscle damage and calpain-calpastatin gene expression in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2008 Jun;103(3):323-32.

Walmsley B, Hodgson JA, Burke RE. Forces produced by medial gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats. *J Neurophysiol*. 1978 Sep;41(5):1203-16.

Walsh LD, Hesse CW, Morgan DL, Proske U. Human forearm position sense after fatigue of elbow flexor muscles. *J Physiol*. 2004 Jul 15;558(Pt 2):705-15.

Warren GL, Hermann KM, Ingalls CP, Masselli MR, Armstrong RB. Decreased EMG median frequency during a second bout of eccentric contractions. *Med Sci Sports Exerc*. 2000 Apr;32(4):820-9.

Warren GL, Ingalls CP, Lowe DA, Armstrong RB. Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury. *Exerc Sport Sci Rev.* 2001 Apr;29(2):82-7.

Wehling-Henricks M, Jordan MC, Gotoh T, Grody WW, Roos KP, Tidball JG. Arginine metabolism by macrophages promotes cardiac and muscle fibrosis in mdx muscular dystrophy. *Plos One.* 2010;5(5):e10763.

Welch JS, Escoubet-Lozach L, Sykes DB, Liddiard K, Greaves DR, Glass CK. TH2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2002 Nov 8;277(45):42821-9.

Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004 Aug;4(8):583-94.

Yanagisawa O, Kurihara T, Okumura K, Fukubayashi T. Effects of strenuous exercise with eccentric muscle contraction: physiological and functional aspects of human skeletal muscle. *Magn Reson Med Sci.* 2010;9(4):179-86.

Yin X, Wang Q, Chen T, Niu J, Ban R, Liu J, Mao Y, Pu C. CD4+ cells, macrophages, MHC-I and C5b-9 involve the pathogenesis of dysferlinopathy. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(3):3069-75.

Yusuf F, Brand-Saberi B. Myogenesis and muscle regeneration. *Histochem Cell Biol.* 2012 Aug;138(2):187-99.

Zanou N, Gailly P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Nov;70(21):4117-30.

Zhang C, Li Y, Wu Y, Wang L, Wang X, Du J. Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration. *J Biol Chem.* 2013 Jan 18;288(3):1489-99.

Zhong B, Yang X, Sun, Q, Liu L, Lan, X, Tian J, He Q, Hou W, Liu H, Jiang C, Gao N, Lu S. Pdc4 modulates markers of macrophage alternative activation and airway remodeling in antigen-induced pulmonary inflammation. *J Leukoc Biol* 2014 Dec;96(6):1065-75.