KAIO FERNANDO VITZEL

Participação do Estresse Oxidativo na Disfunção
Muscular Esquelética em Ratos Diabéticos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

KAIO FERNANDO VITZEL

Participação do Estresse Oxidativo na Disfunção
Muscular Esquelética em Ratos Diabéticos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Vitzel, Kaio Fernando.

Participação do estresse oxidativo na disfunção muscular esquelética em ratos diabéticos / Kaio Fernando Vitzel. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia muscular e diabetes.

Versão do título para o inglês: The involvement of oxidative stress in skeletal muscle dysfunction of diabetic rats.

1. Diabetes mellitus 2. Estresse oxidativo 3. Antioxidante
4. N-acetil-L-cisteína 5. Músculo esquelético 6. Função contrátil
I. Curi, Prof. Dr. Rui II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana
III. Título.

ICB/SBIB0120/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Kaio Fernando Vitzel.

Título da Tese: Participação do estresse oxidativo na disfunção muscular esquelética em ratos diabéticos.

Orientador(a): Prof. Dr. Rui Curi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 100 nas fls. 61 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Rui Curi, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Estresse oxidativo do músculo esquelético no diabetes mellitus: Possível papel modulador dos ácidos graxos saturados"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Kaio Fernando Vitzel, Carlos Hermanto da Justa Pinheiro e o pesquisador Leonardo dos Reis Silveira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **15.10.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de outubro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.036.11

São Paulo, 13 de outubro de 2011.

REF.: Protocolo nº100/08.

"Estresse oxidativo do músculo esquelético no diabetes mellitus: Possível papel modulador dos ácidos graxos saturados"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **estará em vigência até 15.10.2014.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da Comissão de Ética
no Uso de Animal - ICB /USP

Ilmo. Sr.

Prof Dr. Rui Curi

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Às noites que não terminaram

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Rui, minha admiração e respeito.

Aos colegas de laboratório e amigos mais antigos, Carlos, Renato e Haroldo, minha reverência.

Aos mais novos, cuja ajuda também foi importante, Lucas, Marco, Diogo, Alcione e Phablo, minha dívida.

Aos funcionários Tatiana, Bob e Zé Maria, meu reconhecimento.

Ao professor Rolando, George, Steven e Kathryn, minha gratidão.

Aos animais de laboratório, que se comprometeram mais do que eu com a tese, minha responsabilidade.

Aos meus amigos, minha participação.

À Lia, meu coração. À sua família, minha família.

À minha família, minha incondicionalidade.

Ao meu pai, minha melhor lembrança.

À minha mãe, irmãs e avó, tudo.

A mim, minhas sinceras desculpas.

Aos membros do Laboratório de Fisiologia Celular, meu apreço.

Aqueles a quem esqueci momentaneamente, a lembrança será oportuna.

À CAPES, CNPq e FAPESP, pelo suporte financeiro.

A todos, muito obrigado pelo apoio e compreensão por minha ausência e egoísmo.

Agora, separem os times que estou descendo da montanha.

RESUMO

Vitzel KF. Participação do estresse oxidativo na disfunção muscular esquelética em ratos diabéticos. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

O objetivo do estudo foi avaliar a função contrátil do músculo esquelético de ratos diabéticos, correlacionando-a com a ocorrência de estresse oxidativo. Alterações de parâmetros moleculares de potencial antioxidante, síntese e degradação proteica, miogênese, angiogênese, recaptção de cálcio e metabolismo energético também foram investigadas. Ratos Wistar machos foram mantidos diabéticos por 21 dias e tratados com o antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC), 300 mg/kg de peso corpóreo durante 5 dias, para investigar o envolvimento do estresse oxidativo na disfunção contrátil observada no estado diabético. A produção de força máxima, resistência à fadiga e propriedades contráteis (velocidades de contração e relaxamento) dos músculos sóleo e extensor digital longo (EDL) foram avaliadas através da estimulação elétrica *in situ* do nervo ciático. Liberação muscular de H_2O_2 foi estimada em músculo incubado com auxílio da sonda Amplex UltraRed®. O conteúdo proteico de fator induzido por hipóxia-1 alfa (HIF-1 α), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos -1alfa (PGC-1 α) e citocromo c oxidase subunidade IV (COX IV) foi avaliado através de *Western Blotting*. A expressão gênica de transportador de glicose 4 (GLUT4), receptores alfa e beta ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR α e β) e citrato sintase foi avaliada pela técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR). Em ratos diabéticos, ambos os músculos apresentaram estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento no conteúdo de H_2O_2 em relação aos valores obtidos em ratos não diabéticos, o qual foi abolido pelo tratamento com NAC. O músculo sóleo de ratos diabéticos apresentou menor resistência à fadiga quando comparado ao controle. Aliado a este efeito, apresentou também menor conteúdo proteico de HIF-1 α , VEGF, PGC-1 α e COX IV e menor expressão gênica de PPAR α , citrato sintase e GLUT4, o que pode estar associado à menor capacidade oxidativa, biogênese e conteúdo mitocondrial e angiogênese. O tratamento com NAC reduziu a produção de H_2O_2 durante contrações, retardou o desenvolvimento de fadiga e restaurou o conteúdo / expressão dos marcadores citados. O músculo EDL dos ratos diabéticos apresentou diminuição da velocidade de relaxamento. Observou-se também aumento no conteúdo proteico de PGC-1 α , COX IV e na expressão gênica de PPAR β , o que estaria possivelmente associado à conversão de fibras tipo 2/glicolíticas/contração rápida para tipo 1/oxidativas/contração lenta. O tratamento com NAC restabeleceu a expressão / conteúdo desses marcadores e recuperou a velocidade de relaxamento muscular no EDL do rato diabético. Portanto, o estresse oxidativo observado no músculo esquelético durante o estado diabético está associado a alterações específicas em cada músculo avaliado. Ele participaria do desenvolvimento precoce de fadiga e comprometimento do metabolismo energético no músculo sóleo. No EDL, estaria envolvido na conversão de fibras glicolíticas/contração rápida para oxidativas/contração lenta e no comprometimento da recaptção de cálcio.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus*. Estresse Oxidativo. Antioxidante. N-acetil-L-cisteína. Músculo Esquelético. Função contrátil.

ABSTRACT

Vitzel KF. The involvement of oxidative stress in skeletal muscle dysfunction of diabetic rats. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

The aim of the study was to evaluate the association between the contractile function alterations and oxidative stress that occurs in the skeletal muscle of diabetic rats. Alterations of molecular markers related to antioxidant capacity, protein synthesis and degradation, myogenesis, angiogenesis, calcium uptake and energy metabolism were also investigated. Male Wistar rats were kept diabetic for 21 days and then treated with the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC), 300 mg/kg b.w., for 5 days, in order to investigate the role of oxidative stress in the contractile dysfunction induced by diabetes. Electrical stimulation of the sciatic nerve *in situ* was used to evaluate the maximal force production, fatigue resistance e contractile properties (shortening and relaxation speed) of soleus and extensor digitorum lungus (EDL) muscles. Skeletal muscle incubation with Amplex UltraRed® probe was used to measure the release of H₂O₂ from muscle samples. The contents of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1α), vascular endothelial growth factor (VEGF), peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1α) and cytochrome c oxidase subunit IV (COX IV) were assessed by western blotting. The expression of glucose transporter 4 (GLUT4), peroxisome proliferator-activated receptor alpha and beta (PPARα and β) and citrate synthase was evaluated using the quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. In diabetic rats, both muscles had signs of oxidative stress, as shown by the increased H₂O₂ content when compared to the control group. This effect was abolished by the NAC treatment. The soleus muscle of diabetic rats was less resistant to fatigue than control. In addition, it also presented reduced content of HIF-1α, VEGF, PGC-1α and COX IV and decreased expression of PPARα, citrate synthase and GLUT4, which can be associated to impairment of oxidative metabolism, angiogenesis and mitochondrial biogenesis. The treatment with NAC decreased soleus muscle production of H₂O₂ during contractions, delayed the onset of fatigue and restored the content / expression of the markers cited above. The EDL muscle of diabetic rats presented slowed relaxation. It also showed an increase of PGC-1α and COX IV content and PPARβ expression, which could be related to the conversion of type 2/glycolytic/fast fibers to type 1/oxidative/slow fibers. The NAC treatment reestablished the content / expression of those markers and restored the relaxation speed of the EDL muscle from diabetic rats. In summary, the oxidative stress of skeletal muscle induced by diabetes is associated with specific alterations on EDL and soleus muscles. Oxidative stress may take part in the early onset of fatigue and energy metabolism impairment of soleus muscle from diabetic rats. In the EDL muscle, it could be involved in the conversion of glycolytic/fast fibers to oxidative/slow fibers and calcium uptake impairment.

Keywords: *Diabetes mellitus*. Oxidative stress. Antioxidants. N-acetyl-L-cysteine. Skeletal muscle. Muscle contractile activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Produtos avançados de glicação <i>Advanced glycation end products</i>
AGL	Ácidos graxos livres
AKT ou PKB	Proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP <i>AMP-activated protein kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell leukemia / lymphoma 2</i>
CaMKII	Proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina <i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CaMKK	Quinase da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina <i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase</i>
cAMP	AMP cíclico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX IV	Citocromo c oxidase subunidade IV
CPT1	Carnitina palmitoiltransferase 1
CREB	Elemento de ligação responsivo ao cAMP <i>cAMP response element-binding</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
EDL	Extensor digital longo
EDTA	Ácido diaminoetanotetraacético
eIF2 α	Fator eucariótico de iniciação da tradução 2alfa <i>Eukaryotic translation initiation factor 2alpha</i>
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto <i>Fibroblast growth factor</i>

GLUT4	Transportador de glicose 4 <i>Glucose transporter 4</i>
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduced
GSSG	Glutathione oxidized
HIF-1 α	Fator induzido por hipóxia-1 alfa <i>Hypoxia-inducible factor-1 alpha</i>
HRT	<i>Half relaxation time</i>
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1 <i>Insulin-like growth factor-1</i>
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
MRFs	Fatores de regulação da miogênese <i>Myogenic regulatory factors</i>
LDL	Lipoproteínas de densidade baixa <i>Low-density lipoprotein</i>
MEF-1	<i>Muscle enhancer factor-1</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MURF1	<i>Muscle RING-finger protein 1</i>
Myf5	Fator miogênico 5 <i>Myogenic factor 5</i>
MyoD	Fator de diferenciação miogênica <i>Myogenic differentiation factor</i>
NAC	N-acetil-L-cisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF- κ B	Fator nuclear- kappaB <i>Nuclear factor - kappaB</i>
NRF2	Fator respiratório nuclear 2 <i>Nuclear respiratory factor 2</i>
p70S6K	p70S6 quinase
PBS	Tampão fosfato

PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular <i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PGC-1 α	Co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos -1alfa <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha</i>
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
PPAR α	Receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomos <i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
PPAR β	Receptor beta ativado por proliferadores de peroxissomos <i>Peroxisome proliferator-activated receptor beta</i>
PPAR γ	Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
RBL2	<i>Retinoblastoma like-2</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real <i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RyR1	Receptor de rianodina tipo 1
S6K	S6 quinase
SDH	Succinato desidrogenase
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SERCA1 e 2	ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático 1 e 2 <i>Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 1 e 2</i>
SOD	Superóxido dismutase
T ₃	Triiodotironina
Tfam	Fator de transcrição mitocondrial A <i>Mitochondrial transcription factor A</i>
TG	Triacilgliceróis
TGF- β	Fator transformador de crescimento-beta <i>Transforming growth factor-beta</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>

TTP	<i>Time to peak</i>
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa <i>Very low-density lipoprotein</i>
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
YY1	<i>Yin-Yang1</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Fontes geradoras de espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético.....	17
2.2 Sistemas antioxidantes do músculo esquelético.....	17
2.3 Sinalização redox e estresse oxidativo.....	18
2.4 <i>Diabetes mellitus</i> e alterações metabólicas.....	19
2.5 Estresse oxidativo no diabetes: um componente das complicações fisiopatológicas da doença.....	21
2.6 Resposta aguda do músculo esquelético ao estresse oxidativo.....	22
3 JUSTIFICATIVA.....	24
4 OBJETIVOS.....	25
4.1 Parâmetros avaliados.....	25
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5.1 Animais e tratamento.....	27
5.2 Estimulação elétrica <i>in situ</i>.....	29
5.3 Análise da força muscular máxima, propriedades contráteis e fadiga.....	29
5.4 Liberação de H₂O₂.....	30
5.5 Extração de RNA total, síntese de cDNA e RT-PCR.....	31
5.6 <i>Western blotting</i>.....	33
5.7 Conteúdo de glicogênio.....	34
5.8 Conteúdo de VEGF.....	34
5.9 Análise Estatística.....	34
6 RESULTADOS.....	35
6.1 Liberação de H₂O₂ avaliada por Amplex UltraRed.....	35
6.2 Expressão gênica de GPX1, SOD1, SOD2 e catalase avaliada por RT-PCR.....	37
6.3 Função contrátil muscular.....	40
6.3.1 <i>Força isotônica</i>	40
6.3.2 <i>Força tetânica</i>	41
6.3.3 <i>Propriedades contráteis</i>	43
6.3.4 <i>Fadiga</i>	44
6.4 Conteúdo de glicogênio.....	46

6.5 Conteúdo de VEGF, avaliado por ELISA, e HIF-1 α , avaliado por <i>western blotting</i>	47
6.6 Conteúdo de SERCA1 e SERCA2 avaliado por <i>western blotting</i>	49
6.7 Conteúdo de PGC-1 α , COX IV, NRF2 e CPT1 avaliado por <i>western blotting</i>	51
6.8 Expressão gênica de PPAR α , PPAR β e GLUT4 avaliada por RT-PCR.....	55
6.9 Expressão gênica de citrato sintase e SDH avaliada por RT-PCR.....	58
6.10 Conteúdo de MURF1 e atrogina-1 avaliado por <i>western blotting</i>	60
6.11 Razão fosfo-S6 / S6 total e fosfo-eIF2 α / eIF2 α total avaliada por <i>western blotting</i>	61
6.12 Expressão gênica de MyoD, Myf5, miogenina e PCNA avaliada por RT-PCR.....	63
6.13 Expressão gênica de IGF-1, miostatina e folistatina avaliada por RT-PCR.....	67
6.14 Expressão gênica de fatores pró e anti-apoptóticos avaliada por RT-PCR.....	70
6.15 Razão fosfo-AMPK α / AMPK α total avaliada por <i>western blotting</i>	71
6.16 Conteúdo de desmina avaliado por <i>western blotting</i>	72
7 DISCUSSÃO.....	73
7.1 Efeitos do estado diabético sobre os músculos sóleo e EDL de ratos.....	74
7.2 Efeitos do tratamento com NAC sobre os músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos.....	85
7.3 Efeitos do tratamento com NAC sobre os músculos sóleo e EDL de ratos controles.....	93
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
9 CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	101
APÊNDICE A – Parâmetros eletrofisiológicos do nervo ciático.....	117
APÊNDICE B – Tabela de resumo das alterações causadas pelo estado diabético e tratamento com NAC nos músculos sóleo e EDL de ratos.....	118
APÊNDICE C – <i>Ponceau</i> e <i>western blots</i> de α -tubulina e β -actina.....	120
APÊNDICE D – Quadros de resultados.....	122
APÊNDICE E – Artigos publicados em periódicos.....	140

1 INTRODUÇÃO

O músculo esquelético produz continuamente espécies reativas de oxigênio (EROs). Por muito tempo acreditou-se que elas estivessem associadas apenas a efeitos deletérios às funções celulares. Atualmente, há evidências que suportam a proposição de que elas atuam como moléculas reguladoras de diversas funções no músculo esquelético, incluindo captação de glicose, prolongamento do transiente de cálcio, biogênese mitocondrial, proliferação de células satélites, modulação de vias de sinalização e regulação da expressão gênica. Estímulos como contração, insulina, citocinas, epinefrina e norepinefrina aumentam transitoriamente a produção de EROs no músculo.

A depleção das EROs no músculo é realizada por sistemas antioxidantes e o balanço entre produção e detoxicação é importante para a manutenção do equilíbrio redox no tecido. O estresse oxidativo ocorre em situações crônicas de maior produção de EROs ou menor defesa antioxidante, causando lesões em estruturas celulares e comprometimento da sinalização redox. Situações patológicas, como distrofia muscular, obesidade, insuficiência cardíaca e diabetes apresentam estresse oxidativo no músculo esquelético.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fontes geradoras de espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético

No tecido muscular, duas das mais importantes fontes de EROs são o complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) oxidase e a mitocôndria, através da cadeia de transporte de elétrons (Ferreira, Reid, 2008). A primeira, presente na membrana plasmática e túbulos T das células musculares, produz o $O_2^{\cdot-}$ (ânion superóxido) a partir do O_2 (oxigênio molecular) utilizando elétrons do NADPH como poder redutor (Babior, 2004). A segunda produz $O_2^{\cdot-}$ através da redução do O_2 por elétrons dos componentes iniciais e intermediários da cadeia de transporte de elétrons (Ferreira, Reid, 2008; Maccarrone, Ullrich, 2004; Oktyabrsky, Smirnova, 2007), principalmente dos complexos I e III e da $SQ^{\cdot-}$ (semiquinona) (Bellin et al., 2006). A xantina oxidase, presente no interior das mitocôndrias, também é uma fonte produtora de $O_2^{\cdot-}$ para o tecido muscular, principalmente em seu compartimento vascular e durante fenômenos de hipóxia-reoxigenação (Clanton et al., 1999). Ocorre também expressão e atividade mais elevadas da xantina oxidase no músculo esquelético de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina (Bravard et al., 2011). A inibição da enzima por oxipurinol diminui o conteúdo de marcadores de estresse oxidativo nesses animais (Bravard et al., 2011).

2.2 Sistemas antioxidantes do músculo esquelético

As células apresentam equilíbrio redox, entre a produção de EROs, através de seus oxidantes, e a degradação e seqüestro desses compostos, através de antioxidantes (Bloch-Damti, Bashan, 2005), que convertem diferentes EROs em produtos menos reativos (Harris, 1992). Eles podem ser oxidados pelas EROs e por moléculas anteriormente oxidadas (revertendo-as à sua forma inicial reduzida), diminuindo o conteúdo dessas na célula (Ferreira, Reid, 2008). Entre os antioxidantes do tecido muscular destaca-se o tripeptídeo glutathiona reduzida (GSH), formado por glutamato, cisteína e glicina (Dalton et al., 2004; Sen, Packer, 2000). É uma molécula abundante na célula, com concentrações que variam entre 1 e 10 mM dependendo do tipo celular (Dalton et al., 2004). Possui um grupo tiól (resíduo de

cisteína livre) que é facilmente oxidado por EROs ou outras moléculas anteriormente oxidadas. A GSH age em conjunto com a enzima glutathiona peroxidase (GPX), que catalisa a oxidação da GSH, principalmente por H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) ou peróxidos lipídicos (Dalton et al., 2004); e com enzima glutathiona redutase (GR), que converte a glutathiona oxidada (GSSG) em GSH utilizando NADPH, recuperando a capacidade antioxidante do sistema (Ferreira, Reid, 2008; Ji, 2007; Oktyabrsky, Smirnova, 2007). A GSH também age no ciclo de oxidação / redução de outros antioxidantes, como das vitaminas C e E, aumentando a eficácia destes (Sen, Packer, 2000). Outras enzimas antioxidantes importantes são a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (Ferreira, Reid, 2008; Turrens, 2003). A primeira, com maior atividade no tecido muscular, catalisa a síntese de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) a partir de $\text{O}_2^{\cdot -}$, um processo denominado dismutação (Turrens, 2003). Esta possui uma forma citoplasmática, a SOD1, e uma forma intramitocondrial, a SOD2 (Ferreira, Reid, 2008; Turrens, 2003). A segunda converte H_2O_2 em H_2O , mas é pouco representativa na musculatura esquelética (Turrens, 2003). Outros compostos antioxidantes importantes no tecido muscular são a tioredoxina, peroxirredoxina e glutarredoxina (Ferreira, Reid, 2008; Oktyabrsky, Smirnova, 2007). A tioredoxina, assim como a GSH, é outra molécula antioxidante, que pode ser oxidada pelas EROs ou outras moléculas anteriormente oxidadas e ser novamente reduzida pela tioredoxina redutase em uma reação dependente de NADPH (Oktyabrsky, Smirnova, 2007). A peroxirredoxina age detoxicando uma série de oxidantes, mediando a oxidação de moléculas que possuem grupo tiól, como a GSH ou a tioredoxina (Oktyabrsky, Smirnova, 2007). A glutarredoxina tem papel semelhante às moléculas já descritas, sendo reduzida pelo sistema GSH / GR (Oktyabrsky, Smirnova, 2007).

2.3 Sinalização redox e estresse oxidativo

As EROs interagem com uma série de componentes celulares, incluindo lipídeos, proteínas e DNA, alterando a atividade de enzimas, fatores de transcrição e membranas (Baynes, 1991), tornando-se um sinalizador importante. Assim, o controle do balanço redox intracelular pela atividade dos oxidantes e antioxidantes se torna fundamental para o funcionamento celular (Maccarrone, Ullrich, 2004).

Se o conteúdo de EROs se mantiver sob estrito controle celular, estas podem agir sobre as diferentes moléculas reguladoras das funções da célula oxidando-as reversivelmente em seus resíduos de Cys-SH (cisteína livre), formando Cys-SOH (resíduos sulfênicos), que podem sofrer S-glutathionilação pela GSH e, dessa maneira, terem sua atividade modulada pelas EROs (Demasi et al., 2003; Maccarrone, Ullrich, 2004; van Montfort et al., 2003;). Assim, a sinalização redox regula as funções celulares através do controle entre produção e depleção de EROs por sítios específicos. Isto permite a ocorrência de sinalização celular através de vias redox-sensíveis específicas (Packer et al., 2008). Porém, se os conteúdos de EROs se tornarem elevados demais devido ao desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes, as mesmas moléculas podem sofrer um grau maior de oxidação em seus resíduos de Cys-SH (cisteína livre). Ocorrem então reações de GSSG com Cys-SH e/ou a formação de Cys-SO₂H (resíduos sulfínicos) e Cys-SO₃H (resíduos sulfônicos), estes apresentando grau de oxidação irreversível (Demasi et al., 2003; van Montfort et al., 2003). Tais reações alteram irreversivelmente as características das moléculas reguladoras e, juntamente com os danos ao DNA e às membranas lipídicas (peroxidação de lipídeos) causados pelo alto conteúdo de EROs, podem levar à perda de funções celulares ou até à morte celular (Maccarrone, Ullrich, 2004). Nesta condição, na qual o desequilíbrio entre produção e depleção de EROs causa comprometimento na sinalização de circuitos redox compartimentalizados (Packer et al., 2008), fica caracterizado o fenômeno de estresse oxidativo.

2.4 Diabetes mellitus e alterações metabólicas

O *diabetes mellitus* é um grande problema de saúde pública mundial. No ano 2000 havia 171 milhões de pessoas diabéticas no mundo, sendo 4,5 milhões no Brasil (Wild et al., 2004). Em 2010, a prevalência prevista de diabetes entre adultos no mundo foi de aproximadamente 285 milhões de pessoas, ou 6,4% da população adulta (Shaw et al., 2010). Projeções de 2004 indicavam que no ano de 2030 existiriam no mundo 366 milhões de diabéticos (Wild et al., 2004), mas estimativas mais recentes aumentam para 439 milhões o número de adultos (entre 20 e 79 anos) diabéticos nesse ano – 7,7% deste grupo populacional (Shaw et al., 2010). Entre 2010 e 2030 estima-se que o número de adultos diabéticos aumente em 20%

nos países desenvolvidos e 69% nos países em desenvolvimento. No Brasil, a população com diabetes no ano 2000 era de 4,5 milhões de pessoas (Wild et al., 2004). Em 2010, a estimativa de adultos diabéticos no Brasil era de 7,6 milhões (Shaw et al., 2010). As projeções de 2004 indicavam que em 2030 o Brasil teria 11,3 milhões de diabéticos (Wild et al., 2004), mas novas estimativas de 2010 aumentam este número para 12,7 milhões (Shaw et al., 2010). Embora o diabetes tipo I represente de 5 a 10% do total de casos, este valor pode estar subestimado, pois se acredita que de 5 a 15% dos diagnósticos de diabetes tipo II sejam na verdade tipo I (Atkinson, 2012). Mesmo com tais imprecisões estatísticas, o diabetes tipo I é uma das doenças crônicas de ocorrência mais comum na infância (Gale, 2005; Karvonen et al., 2000).

O diabetes tem como características fundamentais hiperglicemia e dislipidemia, com elevação das concentrações sanguíneas de triacilgliceróis (TG), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL - *very low-density lipoprotein*), lipoproteínas de densidade baixa (LDL - *low-density lipoprotein*) e ácidos graxos livres (AGL) e intensa proteólise muscular (Avramoglu et al., 2006; Eckel et al., 2005; Lecker et al., 1999; Smith et al., 1989). Esses efeitos são causados pela ausência / redução na secreção de insulina (diabetes tipo I) ou resistência à ação da insulina (diabetes tipo II), reduzindo a captação de glicose (principalmente no músculo esquelético e em adipócitos), a supressão da gliconeogênese hepática e da lipólise no tecido adiposo, além da síntese proteica muscular (Avramoglu et al., 2006; Eckel et al., 2005; Lecker et al., 1999; Smith et al., 1989).

O diabetes tipo I surge, na grande maioria dos casos, em consequência da destruição autoimune das células β pancreáticas, produtoras de insulina. Indivíduos com predisposição genética são expostos a fatores ambientais que desencadeiam a autoimunidade (Atkinson, 2012). Dentre os anticorpos produzidos, estão aqueles contra a célula β , a enzima descarboxilase do ácido glutâmico, insulina, tirosina fosfatase transmembrana e molécula ZnT8 (Atkinson, 2012). É comumente diagnosticada em crianças e adolescentes que apresentam como sintomas a polidipsia, poliúria e polifagia (sede, produção de urina e fome excessivas, respectivamente), além da hiperglicemia. A necessidade de reposição de insulina é vitalícia.

Além da insulina, o diabetes tipo 1 apresenta outras alterações hormonais, como elevação plasmática de glicocorticóides (Roy et al., 1990) e redução do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1 - *insulin-like growth factor-1*) (Masaoka et al., 2003), o primeiro contribuindo para maior catabolismo (Goldberg, Goodman, 1969) e o segundo para menor síntese proteica muscular (Glass, 2005; Sandri, 2008). Conforme revisado por Brownlee (2001), a hiperglicemia típica do quadro diabético causa ativação da via dos polióis e da proteína quinase C (PKC) β e δ , aumento do fluxo de metabólitos pela via das hexosaminas e formação de produtos avançados de glicação (AGE - *advanced glycation end products*). Estas alterações levam à ocorrência de angiopatia, neuropatia e miopatia. A miopatia diabética é uma condição que envolve fraqueza, redução de massa e redução da força e tolerância ao exercício do músculo esquelético (Krause et al., 2011). Estas alterações estão associadas à desestruturação dos sarcômeros, redução da atividade de enzimas do metabolismo oxidativo, maior proteólise, aumento do conteúdo intramiocelular de lipídeos, diminuição da síntese proteica e alterações da cinética do cálcio muscular (Krause et al., 2011).

2.5 Estresse oxidativo no diabetes: um componente das complicações fisiopatológicas da doença

Pacientes com diabetes apresentam estresse oxidativo sistêmico (Bonnard et al., 2008; Ramakrishna, Jailkhani, 2008) que envolve diferentes tecidos (Maritim et al., 2003; Matkovics et al., 1997), incluindo músculo esquelético (Aragno et al., 2004; Bravard et al., 2011; Gumieniczek et al., 2001; Matkovics et al., 1997). O estresse oxidativo nestas condições pode ser induzido pelas concentrações elevadas de glicose e AGL plasmáticos (Bloch-Damti, Bashan, 2005; Brownlee, 2001; Jellinger, 2007; Kraegen, Cooney, 2008) típicas da doença.

A condição do estado diabético, envolvendo hiperglicemia, valores de AGL plasmáticos elevados e estresse oxidativo são fatores que originam parte das complicações fisiopatológicas, incluindo alterações musculares. Essas alterações envolvem ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B - *nuclear factor- κ B*), desequilíbrio do metabolismo proteico, comprometimento da função mitocondrial, resistência à sinalização da insulina, danos oxidativos às estruturas celulares e alteração da sinalização redox. Esses fatores interagem em um sistema de

retroalimentação positiva. O estresse oxidativo e AGL causam ativação de NF- κ B no músculo esquelético (Kraegen, Cooney, 2008; Li et al., 1998; Silveira et al., 2008), o que modula a miogênese (Bakkar, Guttridge, 2010; Guttridge et al., 2000) e a degradação proteica muscular (Bassel-Duby, Olson, 2006; Glass, 2005; Li et al., 1998; Sandri, 2008). Ativação da via clássica do NF- κ B aumenta a expressão de ciclina D1, que age como repressor miogênico (Skapek et al., 1995), inibe a síntese do fator de diferenciação miogênica (MyoD - *myogenic differentiation factor*), determinante da linhagem miogênica (Pownall et al., 2002), e ativa o fator de transcrição *Yin-Yang1* (YY1), um repressor de genes da linhagem miogênica como troponina I2, troponina C, cadeia pesada de miosina IIb e α -actina (Wang et al., 2007). A ativação do fator nuclear também aumenta a expressão da *muscle RING-finger protein 1* (MURF1) (Cai et al., 2004), que estimula a proteólise muscular (Bodine et al., 2001; Gomes et al., 2001). A ativação de NF- κ B e o estresse oxidativo também estão relacionados com a resistência à insulina (Brownlee, 2001; Kraegen, Cooney, 2008; Silveira et al., 2008), e a inibição da sinalização insulínica também promove perda de proteína do músculo esquelético (Glass, 2005; Sandri, 2008). O estresse oxidativo pode ainda inibir enzimas do metabolismo energético como aconitase e α -cetoglutarato desidrogenase (Andersson et al., 1998) e está relacionado a danos oxidativos e alterações estruturais e funcionais na mitocôndria (Bonnard et al., 2008; Fan et al., 2010; Fariss et al., 2005; Kuwahara et al., 2010), que em conjunto com uma exposição crônica a ácidos graxos, pode causar redução da capacidade oxidativa e disfunção mitocondrial (Hirabara et al., 2007; Kraegen, Cooney, 2008; Silveira et al., 2008; van Loon, Goodpaster, 2006). Uma menor capacidade de oxidação mitocondrial leva ao maior acúmulo de ácidos graxos (Krause et al., 2011; Silveira et al., 2008) no músculo, intensificando os processos descritos.

2.6 Resposta aguda do músculo esquelético ao estresse oxidativo

O estresse oxidativo em curto prazo leva a uma resposta que se contrapõe às alterações fisiopatológicas do diabetes apresentadas acima. O estresse oxidativo ativa a proteína quinase ativada por AMP (AMPK - *AMP-activated protein kinase*) (Long, Zierath, 2006). Esta quinase estimula no músculo a quebra de TG, oxidação de ácidos graxos e captação de glicose (Witczak et al., 2008), importante para o

músculo do diabético, que está submetido a concentrações elevadas desses metabólitos. O estresse oxidativo pode também, em curto prazo, aumentar a sensibilidade à insulina (Loh et al., 2009), relevante para melhorar a sinalização do hormônio em resposta à sua ausência (diabetes tipo 1) ou à situação de menor sensibilidade insulínica do tecido (diabetes tipo 2). O breve aumento no conteúdo de EROs em fibras musculares esqueléticas resulta em aumento na produção de força (Reid et al., 1993), seja por maior ativação do receptor de rianodina tipo 1 (RyR1) (Hidalgo et al., 2006) e aumento na liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Favero et al., 1995), ou por aumento na sensibilidade das miofibrilas ao cálcio (Andrade et al., 1998, 2001; Posterino et al., 2003). Isto seria importante para manutenção da força na situação de hipotrofia apresentada pelo músculo diabético.

Inicialmente, a maior produção de EROs no músculo esquelético do diabético representaria uma resposta às alterações patológicas da doença, aumentando a captação de glicose e oxidação de metabólitos, a sensibilidade à insulina e a produção de força. Porém, a manutenção de um estresse oxidativo crônico passa a contribuir para a fisiopatologia do diabetes. Nessas condições, o músculo esquelético do diabético apresenta menor síntese e maior degradação proteica, redução do metabolismo energético e alteração da cinética do cálcio (Andrade et al., 1998, 2001; Benders et al., 1997; Lesniewski et al., 2003), o que, consequentemente, causa alterações de parâmetros da função contrátil. Dentre eles está a redução da força absoluta, menor resistência à fadiga, maior tempo de contração e relaxamento muscular, variando de acordo com a musculatura estudada (De Angelis et al., 2004; Halvatsiotis et al., 2002; Hebert, Nair, 2010; Krause et al., 2009; Krishnamurthy et al., 1992; Ljubisavljevic et al., 2010; McGuire, MacDermott, 1998, 1999; Stephenson et al., 1994; Vignaud et al., 2007;).

3 JUSTIFICATIVA

O estresse oxidativo no músculo esquelético que ocorre no quadro diabético está associado às diversas alterações que prejudicam a função contrátil muscular, incluindo redução da tolerância ao exercício. Este parâmetro é considerado preditor independente de mortalidade em pacientes diabéticos (Regensteiner et al., 1995). Terapias que reduzem o estresse oxidativo no músculo esquelético melhoram a performance no exercício físico (Powers, Jackson, 2008; Reid, 2001). Apesar disso, o envolvimento do estresse oxidativo e o efeito do tratamento com antioxidantes na miopatia diabética permanece sob investigação.

Dentre as terapias utilizadas está o tratamento com N-acetil-L-cisteína (NAC), um potente antioxidante que reduz o estresse oxidativo ou se contrapõe ao excesso de produção de EROs (Aruoma et al., 1989; Bonnard et al., 2008; Ji et al., 2007; Medved et al., 2004; Pinheiro et al., 2012; Powers, Jackson, 2008; Powers, Lennon, 1999; Reid, 2001; Sen, Packer, 2000). A presença de resíduo tiól no NAC o torna um seqüestrador de determinadas EROs, como H_2O_2 e $OH^\cdot$, mas não $O_2^\cdot$ (Aruoma et al., 1989). Pode também aumentar a disponibilidade de cisteína para a síntese de GSH pelo fornecimento de sua cisteína acetilada ou por promover a redução extracelular de cistina à cisteína (Sen, Packer, 2000).

4 OBJETIVOS

O objetivo do estudo foi realizar análise sistemática da função contrátil do músculo esquelético do diabético, correlacionando-a com alterações de parâmetros moleculares de potencial antioxidante, síntese e degradação proteica, miogênese, angiogênese, recaptação de cálcio e metabolismo energético. Realizou-se também o tratamento dos ratos diabéticos com NAC para investigar a participação do estresse oxidativo no desenvolvimento ou manutenção das alterações citadas.

4.1 Parâmetros avaliados

Foram avaliados os seguintes parâmetros nos músculos sóleo e extensor digital longo (EDL):

- 1- Produção de EROs (liberação de H_2O_2);
- 2- Potencial antioxidante: expressão das enzimas GPX1 (glutathione peroxidase 1), SOD1, SOD2 e catalase;
- 3- Função contrátil: forças isotônica e isométrica (tetânica), velocidade de contração e relaxamento muscular, tempo de sustentação da tetania, manutenção da força durante 10 contrações tetânicas sucessivas;
- 4- Metabolismo energético: conteúdo de glicogênio; expressão do transportador de glicose 4 (GLUT4 - *glucose transporter 4*); marcadores de biogênese e conteúdo mitocondrial e de expressão de enzimas do metabolismo oxidativo – receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR α - *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*), receptor beta ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR β - *peroxisome proliferator-activated receptor beta*), co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos-1alfa (PGC-1 α - *peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1alpha*), citocromo c oxidase subunidade IV (COX IV), carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1), fator respiratório nuclear 2 (NRF2 - *nuclear respiratory factor 2*), succinato desidrogenase (SDH), citrato sintase;
- 5- Angiogênese: conteúdo do fator induzido por hipóxia-1 alfa (HIF-1 α - *hypoxia-inducible factor-1 alpha*) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - *vascular endothelial growth factor*);

- 6- Recaptação de cálcio: conteúdo das ATPases de cálcio do retículo sarcoplasmático 1 e 2 (SERCA1 e 2 - *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 1 e 2*);
- 7- Degradação proteica via sistema ubiquitina-proteassomo: conteúdo de MURF1 e atrogina-1;
- 8- Síntese proteica: fosforilação de S6 e do fator eucariótico de iniciação da tradução 2alfa (eIF2 α - *eukaryotic translation initiation factor 2alpha*);
- 9- Proliferação e diferenciação miogênica: expressão de MyoD, fator miogênico 5 (Myf5 - *myogenic factor 5*), miogenina, antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA - *proliferating cell nuclear antigen*);
- 10- Fatores de estímulo/repressão da hipertrofia muscular: IGF-1, miostatina e follistatina;
- 11- Fatores pró e anti-apoptóticos: expressão de *Bcl-2 associated X protein* (Bax) e *B-cell leukemia-2* (Bcl-2).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais e tratamento

Ratos Wistar machos (100 ± 20 g) foram obtidos do biotério “Lor Cury” do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do ICB/USP. Os animais foram mantidos em grupos de três com água e alimentação *ad libitum* em sala com ciclo claro-escuro de 12/12 horas a 23 ± 2 °C. Os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) do ICB/USP.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: controle (não tratados, receberam apenas o veículo do tratamento); NAC (tratados com NAC por 5 dias antes do sacrifício); diabéticos (mantidos diabéticos por 28 dias, receberam apenas o veículo do tratamento); diabéticos + NAC (mantidos diabéticos por 22 dias e tratados com NAC por 5 dias). Vinte e quatro horas após o último tratamento, os animais foram anestesiados para subseqüentes procedimentos e isolamento dos músculos sóleo e EDL (extensor digital longo) (Figura 1).

O diabetes tipo 1 experimental foi induzido pela injeção intravenosa de estreptozotocina (S0130, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), dissolvida em tampão citrato (pH 4,2), na dose de 65 mg/kg de massa corporal. Os grupos controle e NAC receberam apenas tampão citrato. Após quarenta e oito horas da injeção de estreptozotocina, o estado diabético foi confirmado considerando glicemia acima de 200 mg/dL, estimada com o auxílio de medidor de glicose (Accu-Chek Active®, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Imediatamente antes de iniciar o tratamento com antioxidante, o estado diabético era novamente confirmado. Apenas animais com glicemia acima de 450 mg/dL foram utilizados. As amostras de sangue foram obtidas através de corte na extremidade da cauda do animal.

O tratamento com NAC (A7250, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi realizado através de injeção intraperitoneal da droga, dissolvida em tampão fosfato (PBS), na dose de 300 mg/kg de massa corporal, uma vez ao dia durante 5 dias. Os grupos controle e diabético receberam apenas PBS.

Figura 1 – Esquema do protocolo experimental do estudo.

AMPKα: proteína quinase alfa ativada por AMP - *AMP-activated protein kinase alpha*; Bax: *Bcl-2-associated X protein*; Bcl-2: *B-cell leukemia / lymphoma 2*; COX IV: citocromo c oxidase subunidade IV; CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1; EDL: extensor digital longo; eIF2α: fator eucariótico de iniciação da tradução 2alfa - *eukaryotic translation initiation factor 2alpha*; GLUT4: transportador de glicose 4 - *glucose transporter 4*; GPX1: glutationa peroxidase 1; HIF-1α: fator induzido por hipóxia-1 alfa - *hypoxia-inducible factor-1 alpha*; HRT: *half relaxation time*; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1 - *insulin-like growth factor-1*; MURF1: *muscle RING-finger protein 1*; Myf5: fator miogênico 5 - *myogenic factor 5*; MyoD: fator de diferenciação miogênica - *myogenic differentiation factor*; NAC: N-acetil-L-cisteína; NRF2: fator respiratório nuclear 2 - *nuclear respiratory factor 2*; PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular - *proliferating cell nuclear antigen*; PGC-1α: co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos -1alfa - *peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha*; PPARα e β: receptores alfa e beta ativado por proliferadores de peroxissomos - *peroxisome proliferator-activated receptor alpha e beta*; RT-PCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real - *quantitative real-time polymerase chain reaction*; SDH: succinato desidrogenase; SERCA1 e 2: ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático 1 e 2 - *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 1 e 2*; SOD1 e 2: superóxido dismutase 1 e 2; TTP: *time to peak*; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular - *vascular endothelial growth factor*; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

5.2 Estimulação elétrica *in situ*

O protocolo de estimulação elétrica foi adaptado de Wojtaszewski et al. (1996) e Silveira et al. (2007) e realizado conforme Pinheiro et al. (2012). Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg). A pele dos membros posteriores foi removida. Os músculos que não eram alvo da avaliação foram tenotomizados. O nervo ciático foi acessado e os membros foram fixados em plataforma de acrílico. O membro a ser estimulado foi posicionado na plataforma com a articulação do quadril em ângulo de 60° e a articulação do joelho foi estabilizada mecanicamente em ângulo de 90°. Uma haste metálica foi colocada sob o tendão do músculo a ser estimulado, conectando-o ao transdutor de força (Grass Technologies, West Warwick, Rhode Island, EUA). As contrações musculares foram induzidas através da estimulação elétrica do nervo ciático com auxílio de um eletrodo de platina. O comprimento do músculo em repouso (L0) foi ajustado para obtenção da tensão máxima sob eletroestimulação usando MultiStim System D330 (Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, Hertfordshire, Reino Unido). Avaliou-se a força máxima, propriedades contráteis (velocidades de contração e relaxamento) e fadiga dos músculos sóleo e EDL. Os dados foram analisados utilizando os *softwares* AqAnalysis e AqDados (LYNX - Tecnologia Eletrônica Ltda., Brasil).

5.3 Análise da força muscular máxima, propriedades contráteis e fadiga

O estímulo para produção de contrações isotônicas consistiu de um pulso elétrico de 500 μ s de duração e frequência de 1 Hz. A voltagem foi ajustada para induzir a produção de força máxima. Uma série de 5 contrações foi realizada e usada para determinar a força isotônica absoluta máxima, o tempo de contração (TTP – *time to peak* – tempo entre o início do desenvolvimento de força até a tensão máxima durante a contração) e o tempo de relaxamento (HRT – *half relaxation time* – tempo entre a tensão máxima e a redução de 50% da força durante o relaxamento).

O estímulo para produção de contrações tetânicas (isométricas) consistiu de um pulso de 500 μ s de duração e frequência de 100 Hz. A voltagem foi ajustada para induzir a produção de força máxima. Foi realizada uma série de 10 contrações

tetânicas. A primeira contração teve duração de dez segundos e foi utilizada para avaliação da força tetânica absoluta máxima e do tempo de sustentação da tetania (tempo para perda de 50% da força tetânica máxima). As nove contrações subsequentes tiveram duração de 1 segundo cada e foram realizadas em intervalos de 10 segundos entre elas. Estas contrações foram utilizadas para estimar a queda relativa de força em comparação à força tetânica máxima inicial. A área sob a curva do gráfico gerado pela força *versus* o nº de contrações foi utilizada para o cálculo do índice de fadiga.

As forças isotônica e tetânica específicas foram obtidas através da normalização da força absoluta pelo peso seco do músculo.

A voltagem mínima necessária para induzir uma contração muscular detectável no *tríceps sural* definiu a reobase. A duração mínima de pulso para induzir contração detectável, usando o dobro de voltagem da reobase, determinou a cronaxia.

5.4 Liberação de H₂O₂

Os músculos sóleo e EDL dos ratos anestesiados foram isolados e incubados por 1 hora em 1,5 mL de tampão Krebs-Ringer (contendo em mM: NaCl 118,5, NaHCO₃ 24,7, KCl 4,7, MgSO₄ 1,18, KH₂PO₄ 1,18, CaCl₂ 2,5 e equilibrado com 95% O₂ - 5% CO₂), pH 7,4, 37 °C, com 5,3 mM de glicose, 1% de albumina de soro bovino e na presença de 50 µM do reagente Amplex UltraRed (A36006, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) e 0,1 U/mL de peroxidase (P8250, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Após este período, foram coletados 15 µL do meio e a intensidade de fluorescência foi determinada em fluorímetro nos comprimentos de onda de 530 nm de excitação e 590 nm de emissão. O valor obtido foi normalizado pela massa (mg) do músculo incubado. O Amplex[®] (N-acetil-3,7-diidroxifenoxazina) atua como doador de elétrons para a reação de redução do H₂O₂ catalisada pela peroxidase, na proporção de 1:1 (Zhou et al., 1997). O produto da oxidação do Amplex[®] é denominado resorufina, um composto vermelho, estável e fluorescente, que pode ser quantificado por fluorimetria, sendo uma evidência indireta da quantidade de H₂O₂ da amostra (Zhou et al., 1997). O Amplex[®] é seletivo para H₂O₂ e apresenta baixa interferência em amostras biológicas (Rhee et al., 2010).

O mesmo ensaio, porém com incubações de 5 minutos, foi realizado para avaliação da liberação de H_2O_2 pelo músculo logo após o protocolo de análise da função contrátil. Utilizou-se o músculo contralateral em repouso como referência da produção basal de H_2O_2 em relação ao músculo estimulado.

5.5 Extração de RNA total, síntese de cDNA e RT-PCR

Os músculos sóleo e EDL foram isolados e o RNA total foi extraído utilizando-se o kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme instruções do fabricante.

A concentração de RNA foi estimada por densidade óptica no comprimento de onda 260 nm (cada unidade de leitura corresponde a 40 μ g/mL de RNA), utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EUA).

Foram utilizados 2 μ g de RNA para transcrição reversa e confecção do cDNA, utilizando *primers* oligo-dT e o kit de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) de acordo com especificações do fabricante. A reação de transcrição reversa foi feita na ordem: 70 °C por 10 minutos, 37 °C por 60 minutos e 95 °C por 10 minutos.

Para amplificação das seqüências de interesse do cDNA, foram usados 2 μ L de cDNA, 5 μ L de SYBR Green (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1 μ L (10 μ M) de cada primer *sense* e *anti-sense* do gene-alvo (Tabela 1) e 1 μ L de água Milli-Q autoclavada. A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR - *quantitative real-time polymerase chain reaction*) foi realizada utilizando-se as seguintes etapas: 50 °C por 2 minutos (ativação da enzima), 95 °C por 10 minutos (desnaturação) e 45 ciclos de três fases – a primeira a 95 °C por 20 segundos (desnaturação), a segunda a 58 °C, por 30 segundos (anelamento) e a terceira a 72 °C, por 30 segundos (extensão). A análise da fluorescência proporcionada pelo SYBR Green, conforme amplificação específica da seqüência de interesse, foi feita no detector Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemanha). O *cycle threshold* (CT), ciclo no qual a seqüência de interesse já foi amplificada o suficiente para gerar fluorescência distinguível da fluorescência de fundo (Livak e Schmittgen, 2001) foi avaliado em triplicata para cada amostra. A subtração do CT do gene de interesse pelo CT do gene de referência ou *housekeeping* tem como resultado a variação de CT (Δ CT). As amostras avaliadas foram normalizadas pela média do Δ CT dos animais controle (Δ CT amostra – média Δ CT controle), obtendo-se o valor

de $\Delta\Delta CT$. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001). O gene de referência utilizado foi o *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide* (YWHAZ).

Tabela 1 – Primers utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-PCR.

	<i>Primer Sense (forward)</i>	<i>Primer Antisense (reverse)</i>
MyoD	5'-AGCACTACAGTGGCGACTCA-3'	5'-GCTCCACTATGCTGGACAGG-3'
Miogenina	5'-AGCGCAGGCTCAAGAAAGTGAATG-3'	5'-CTGTAGGCGCTCAATGTACTGGAT-3'
Myf5	5'-CAATCAAGCTTTTCGAGACGC-3'	5'-AGTTCTCTACCTGCTCCCTC-3'
Miostatina	5'-TACCACGGAAACAATCATTACCAT-3'	5'-TGCCATCCGCTTGCAAT-3'
Folistatina	5'-AGCGAGTGTGCCATGAAG-3'	5'-GAGTGGAAGAGATAGGGAAGC-3'
IGF-1	5'-AAGCCTACAAAGTCAGCTCG-3'	5'-GGTCTTGTTCCTGCACTT-3'
GLUT4	5'-GGCATGATTTCTCCTTTCTC-3'	5'-CCAGCACAGCCAAGACAT-3'
SDH	5'-CGGAAGCACGGAAGGAGTC-3'	5'-CAGTAGGAACGGATAGCAGGAG-3'
Citrato sintase	5'-CGGTTCTTGATCCTGATGAGGG-3'	5'-ACTGTTGAGGGCTGTGATGGC-3'
GPX1	5'-GTCCACCGTGTATGCCTTC-3'	5'-CTCTTCATTCTTGCCATTCTC-3'
SOD1	5'-CCAGCGGATGAAGAGAGG-3'	5'-CCAATCACACCACAAGCC-3'
SOD2	5'-GACCTGCCTTACGACTATG-3'	5'-TACTTCTCCTCGGTGACG-3'
Catalase	5'-ATTGCCGTCCGATTCTCC-3'	5'-CCAGTTACCATCTTCAGTGTAG-3'
Bax	5'-GGAGATGAACTGGACAATAATATGG-3'	5'-GCAAAGTAGAAGAGGGCAACC-3'
Bcl-2	5'-GCAGAGATGTCCAGTCAG-3'	5'-CCCACCGAACTCAAAGAAGG-3'
PCNA	5'-ACGTCTCCTTAGTGAGCTTACTCT-3'	5'-TAATGATGTCTTCATTACCAGCACAT-3'
PPARα	5'-GGCAGAAATCCTTACCTGTGAAC-3'	5'-TGGCAGCAGTGGAAGAATCG-3'
PPARβ	5'-CGGGAAGAGGAGAAAGAGGAAGTG-3'	5'-CTGCTGGAAGGAAGGGTGTGC-3'
YWHAZ	5'-AGAAGACGGAAGGTGCTGAG-3'	5'-GGTATGCTTGCTGTGACTGG-3'

Bax: *Bcl-2-associated X protein*; Bcl-2: *B-cell leukemia / lymphoma 2*; GLUT4: transportador de glicose 4 - *glucose transporter 4*; GPX1: glutationa peroxidase 1; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1 - *insulin-like growth factor-1*; Myf5: fator miogênico 5 - *myogenic factor 5*; MyoD: fator de diferenciação miogênica - *myogenic differentiation factor*; PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular - *proliferating cell nuclear antigen*; PPAR α e β : receptores alfa e beta ativado por proliferadores de peroxissomos - *peroxisome proliferator-activated receptor alpha e beta*; SDH: succinato desidrogenase; SOD1 e 2: superóxido dismutase 1 e 2; YWHAZ: *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide*.

5.6 Western blotting

Os músculos foram homogeneizados em solução tampão para extração de proteínas contendo ácido diaminoetanotetraacético (EDTA) 10 mM, Tris-Base 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto) 2 mM e aprotinina 0,01 mg/mL. As amostras foram então sonicadas por 30 segundos a 4 °C, tratadas com 1% de Triton – X100 e centrifugadas a 13.000 rpm, a 4 °C, por 20 minutos. O conteúdo total de proteínas do sobrenadante de cada amostra foi estimado conforme Bradford (1976). Quantidades iguais de proteína das amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) de acordo com Shapiro et al. (1967). Em seguida foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Towbin et al., 1979) e tiveram os sítios de ligação inespecíficos bloqueados por 1 hora de incubação com leite em pó desnatado a 5%. A membrana foi então incubada com os anticorpos primários de interesse por 12 horas a 4 °C e posteriormente incubada por 1 hora a 4 °C com anticorpo secundário (IgG, *anti-mouse* ou *anti-rabbit*) conjugado com peroxidase (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, EUA). Após tratamento com o reagente de detecção ECL (Amersham/GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, EUA), as imagens foram obtidas em filmes radiográficos (IBF, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e quantificadas com auxílio do *software* ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, EUA). Os resultados foram normalizados pela carga total de proteína utilizada por amostra (*ponceau*).

Os anticorpos primários utilizados foram α -tubulina (sc5546), atrogina-1 (sc33782), CPT1 (sc20670), MURF1 (sc32920), NRF2 (sc13032) e PGC-1 α (sc13067) da Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, EUA; β -actina (4970), fosfo-AMPK α em Thr 172 (4188), AMPK α (2532), COX IV (4850), desmina (4024), fosfo-eIF2 α em Ser 51 (9721), eIF2 α (9722), fosfo-S6 em Ser 240/244 (4838), S6 (2217), SERCA1 (4272) e SERCA2 (4388) da Cell Signaling Technology (Beverly, Massachusetts, EUA) e HIF-1 α (h6536) da Sigma–Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

5.7 Conteúdo de glicogênio

Os músculos sóleo e EDL foram homogeneizados em solução de ácido perclórico 0,6 N e centrifugados a 13.000 rpm, a 4 °C, por 20 minutos. O sobrenadante foi neutralizado com K_2HCO_3 1 M e utilizado para quantificação do conteúdo de glicogênio em reação baseada na conversão deste em glicose pela enzima amiloglicosidase (Keppler, Decker, 1974). O conteúdo de glicose proveniente do glicogênio foi estimado através de kit (k082, Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e normalizado pela massa de músculo homogeneizada.

5.8 Conteúdo de VEGF

O conteúdo muscular de VEGF foi estimado por ensaio de ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando Duo-set kits (R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, EUA) para a proteína. Os valores obtidos foram normalizados pelo conteúdo proteico das amostras, extraídas de maneira semelhante ao apresentado no item 5.6 *Western blotting*.

5.9 Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism (v4.0, GraphPad Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Para comparação estatística entre os grupos foi utilizado o teste *one-way* ANOVA (*analysis of variance*) usando o pós-teste de Tukey-Kramer ou *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *One-way* ANOVA foi utilizado para comparação geral entre os grupos e observação de diferenças diretas entre eles, especificamente entre controle x NAC, controle x diabéticos, controle x diabéticos + NAC e diabéticos x diabéticos + NAC. *Two-way* ANOVA foi utilizado com o objetivo de isolar as duas variáveis do estudo; o estado diabético e o tratamento com NAC. Desta forma, pode-se reconhecer um possível efeito do tratamento com NAC não detectado pelo *one-way* ANOVA, uma vez que o teste avalia o efeito do tratamento com o antioxidante separadamente nos ratos controle e diabéticos. Esta análise propiciou também verificar a influência do estado diabético na resposta ao tratamento, designada pelo teste como “interação”, outro aspecto importante na interpretação dos resultados.

6 RESULTADOS

Os ratos diabéticos apresentaram peso corporal 27% menor e glicemia 5,2 vezes mais elevada em relação ao controle após 28 dias de diabetes (Tabela 2). As massas dos músculos sóleo e EDL, normalizadas pelo comprimento da tíbia, apresentaram redução de 48% e 59%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle. O tratamento com NAC não modificou esses parâmetros.

Tabela 2 – Peso corporal, glicemia e massa dos músculos sóleo e EDL normalizada pelo comprimento da tíbia.

	Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
Peso (g)	304,2 ± 6,2	305,3 ± 8,6	223,5 ± 4,2***	232,8 ± 6,5***
Glicemia (mg/dL)	95,4 ± 8,3	109,4 ± 2,4	492,8 ± 29***	525,2 ± 25***
Massa sóleo / Tíbia (mg/cm)	6,53 ± 0,25	6,19 ± 0,25	3,4 ± 0,25***	3,43 ± 0,28***
Massa EDL / Tíbia (mg/cm)	6,23 ± 0,65	6,67 ± 0,35	2,55 ± 0,26***	2,47 ± 0,43***

Os resultados (média ± EPM) de no mínimo 5 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. ***= $p < 0,001$ em relação ao controle. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

6.1 Liberação de H₂O₂ avaliada por Amplex UltraRed

Os músculos sóleo e EDL dos ratos diabéticos apresentaram aumento de 62% e 112%, respectivamente, na liberação de H₂O₂ no meio após 1 hora de incubação em relação ao controle (Figura 2). Esta elevação na liberação de H₂O₂ foi abolida pelo tratamento dos animais diabéticos com NAC. Ratos controle tratados com o antioxidante não apresentaram alteração nesse parâmetro, embora tenha sido observada uma tendência de redução na liberação de H₂O₂ neste grupo.

Após atividade contrátil induzida por estimulação elétrica, os músculos sóleo e EDL dos ratos controle apresentaram aumento de 73% e 76%, respectivamente, na liberação acumulada de H₂O₂ durante 5 minutos de incubação em relação à condição de repouso (Figura 3). O tratamento dos animais controle com NAC aboliu esse aumento em ambos os músculos. Os ratos diabéticos, que apresentam maior liberação basal de H₂O₂ nos músculos sóleo e EDL, não apresentaram aumento

adicional de seu conteúdo mediante atividade contrátil. Ratos diabéticos tratados com NAC, embora apresentassem liberação basal de H_2O_2 semelhante ao controle, também não apresentaram elevação significativa na liberação de H_2O_2 em ambos os músculos após contrações do músculo.

Figura 2 – Liberação de H_2O_2 no meio após 1 hora de incubação dos músculos sóleo e EDL.

O tratamento dos ratos diabéticos com NAC reverteu o aumento na liberação de H_2O_2 nos músculos sóleo e EDL observado nos animais diabéticos. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 5 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Figura 3 – Alteração em relação ao repouso na liberação acumulada de H_2O_2 durante 5 minutos em meio de incubação pelos músculos sóleo e EDL, após atividade contrátil induzida por estimulação elétrica *in situ*.

A maior liberação de H_2O_2 nos músculos sóleo e EDL mediante contração apresentada pelo controle foi abolida pelo tratamento com NAC. Ratos diabéticos e diabéticos tratados com NAC não apresentaram aumento na liberação de H_2O_2 no músculo em decorrência da atividade contrátil. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 5 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

6.2 Expressão gênica de GPX1, SOD1, SOD2 e catalase avaliada por RT-PCR

A expressão gênica de GPX1 em ratos diabéticos foi 53% e 36% menor nos músculos sóleo e EDL, respectivamente, em comparação ao controle (Figura 4). O tratamento com NAC recuperou a expressão de GPX1 no músculo sóleo dos ratos diabéticos e, em ratos controle, aumentou sua expressão em 50%. No EDL, o tratamento com NAC não apresentou efeito.

Figura 4 – Expressão gênica de GPX1 nos músculos sóleo e EDL dos quatro grupos estudados.

Ambos os músculos estudados de ratos diabéticos apresentaram redução na expressão de GPX1, efeito revertido apenas no músculo sóleo pelo tratamento com NAC. Ratos controles tratados com o antioxidante também apresentaram aumento na expressão do gene neste músculo. O tratamento com NAC não afetou a expressão do gene no músculo EDL. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando one-way ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; GPX1: glutathione peroxidase 1; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

Os músculos sóleo e EDL não sofreram alteração na expressão de SOD1 em decorrência do diabetes ou do tratamento com NAC (Figura 5).

A expressão gênica de SOD2 nos músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos sofreu redução de 37% e 42%, respectivamente, em comparação ao controle (Figura 6). O tratamento com NAC recuperou a expressão do gene no músculo sóleo dos ratos diabéticos e aumentou sua expressão em 40% neste músculo nos ratos controle. No EDL o tratamento não apresentou efeito.

Figura 5 – Expressão gênica de SOD1 nos músculos sóleo e EDL dos quatro grupos avaliados.

Não houve alteração na expressão gênica de SOD1. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados de no mínimo 5 observações estão apresentados como média $\pm$ EPM. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; SOD1: superóxido dismutase 1; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

Figura 6 – Expressão gênica de SOD2 nos músculos sóleo e EDL dos quatro grupos experimentais.

Ambos os músculos estudados de ratos diabéticos apresentaram redução na expressão de SOD2. No músculo sóleo, o tratamento com NAC recuperou a expressão do gene nos ratos diabéticos e aumentou sua expressão em ratos controles. No músculo EDL, o antioxidante não apresentou efeitos sobre este parâmetro. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 5 observações foram comparados usando one-way ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; SOD2: superóxido dismutase 2; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

A expressão gênica de catalase sofreu elevação de 2,6 vezes no músculo EDL de ratos diabéticos, mas permaneceu semelhante ao controle no sóleo (Figura 7). O tratamento dos ratos diabéticos com NAC reduziu parcialmente este aumento do EDL para 86% em comparação ao controle e não apresentou efeito no sóleo. Por outro lado, o tratamento dos ratos controles com o antioxidante não apresentou efeito no EDL, mas aumentou em 52% a expressão da catalase no sóleo.

Figura 7 – Expressão gênica de catalase nos músculos sóleo e EDL dos quatro grupos avaliados.

O músculo EDL de ratos diabéticos apresentou aumento na expressão de catalase em relação ao controle, efeito revertido parcialmente pelo tratamento com NAC. O músculo sóleo de ratos diabéticos não sofre alteração na expressão do gene, mas, em ratos controle, o tratamento aumentou a expressão de catalase neste músculo. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando one-way ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

6.3 Função contrátil muscular

6.3.1 Força isotônica

Os ratos diabéticos apresentaram redução de 52% e 62% na força isotônica absoluta dos músculos sóleo e EDL, respectivamente (Figura 8), quando comparados ao controle. Por outro lado, não houve alteração significativa na força isotônica específica nos grupos avaliados (Figura 9). O tratamento de ratos controle e diabéticos com NAC não apresentou efeitos sobre tais parâmetros.

Figura 8 – Força isotônica absoluta dos músculos sóleo e EDL nos quatro grupos experimentais.

O grupo diabético apresentou redução na produção de força isotônica absoluta em ambos os músculos avaliados e o tratamento com NAC não apresentou efeitos sobre este parâmetro. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 6 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Figura 9 – Força isotônica específica dos músculos sóleo e EDL nos diferentes grupos experimentais.

Não foi observada diferença significativa na força isotônica específica entre os grupos. Os resultados de no mínimo 5 observações estão apresentados como média $\pm$ EPM. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

6.3.2 Força tetânica

Os ratos diabéticos apresentaram diminuição de 56% e 48% na força tetânica absoluta dos músculos sóleo e EDL, respectivamente, quando comparados ao controle (Figura 10). O tratamento dos animais diabéticos com NAC não alterou este parâmetro nos músculos avaliados, porém, animais controle tratados com o antioxidante apresentaram aumento de 65% na força tetânica absoluta do músculo EDL em relação ao grupo controle. A força tetânica específica do músculo sóleo não foi diferente entre os grupos, porém, o músculo EDL de ratos diabéticos apresentou elevação de 72% nesse parâmetro em relação ao controle (Figura 11). O tratamento de animais diabéticos com NAC não alterou a força tetânica específica nos músculos, mas animais controle tratados com o antioxidante apresentaram aumento de 87% neste parâmetro no músculo EDL quando comparado ao controle.

Figura 10 – Força tetânica absoluta dos músculos sóleo e EDL nos quatro grupos estudados.

O grupo diabético apresentou redução na produção de força tetânica absoluta em ambos os músculos avaliados. O tratamento com NAC apresentou efeito apenas sobre o músculo EDL de ratos controle, causando aumento da força tetânica absoluta. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 6 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Figura 11 – Força tetânica específica dos músculos sóleo e EDL nos diferentes grupos avaliados.

O músculo sóleo não apresentou alteração significativa da força tetânica específica nos diferentes grupos experimentais. O músculo EDL de ratos diabéticos apresentou aumento na força tetânica específica e o tratamento de animais diabéticos com NAC não apresentou efeito. Ratos controle tratados com NAC apresentaram elevação da força tetânica específica em relação ao grupo controle. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 7 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

6.3.3 Propriedades contráteis

Os músculos sóleo e EDL dos grupos estudados não apresentaram alteração no tempo de contração, caracterizado por TTP (Figura 12). O músculo sóleo também não apresentou alteração no HRT, associado ao tempo de relaxamento muscular. Entretanto, o músculo EDL de ratos diabéticos apresentou aumento de 47% no HRT, quando comparado ao controle, efeito que foi revertido pelo tratamento dos animais diabéticos com NAC (Figura 13). Ratos controles tratados com NAC não apresentaram alteração no HRT.

Figura 12 – Tempo de contração muscular, caracterizado pelo parâmetro TTP.

Não houve diferença de TTP nos músculos e grupos avaliados. Os resultados de no mínimo 8 observações estão apresentados como média $\pm$ EPM. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; TTP: *time to peak*.

Figura 13 – Parâmetro HRT, associado ao tempo de relaxamento muscular.

O músculo sóleo não apresentou alteração no HRT dos grupos avaliados. O músculo EDL de ratos diabéticos apresentou aumento em seu HRT, efeito revertido pelo tratamento com NAC. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 8 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; HRT: *half relaxation time*.

6.3.4 Fadiga

O tempo de sustentação da tetania do músculo sóleo dos animais diabéticos apresentou redução de 56% em relação ao controle enquanto no músculo EDL esse parâmetro não sofreu alteração nos grupos estudados (Figura 14). O tratamento com NAC em ratos controle não alterou a sustentação da tetania no músculo sóleo. Em comparação ao grupo diabético, constatou-se a recuperação do tempo de sustentação da tetania (pós-teste de Bonferroni; $p < 0,05$) no músculo sóleo de animais diabéticos tratados com NAC, nesse caso, apenas 13% menor que o grupo controle.

Figura 14 – Tempo de sustentação da tetania dos músculos sóleo e EDL nos quatro grupos experimentais.

O músculo sóleo de ratos diabéticos apresentou diminuição do tempo de sustentação da tetania e o tratamento com NAC recuperou esse parâmetro. O músculo EDL não apresentou alteração na sustentação da tetania. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 7 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Comparando o índice de fadiga do músculo sóleo, estimado pela área sob a curva do gráfico “força *versus* nº de contrações” (Figura 15), os ratos diabéticos apresentaram menor resistência à fadiga em relação ao controle, enquanto o tratamento dos animais diabéticos com NAC reverteu tal efeito (Figura 16). Ratos controles tratados com o antioxidante apresentaram maior resistência à fadiga quando comparados ao grupo controle. Não houve alteração na resistência à fadiga do músculo EDL nos grupos estudados.

Figura 15 – Redução da força durante 10 contrações tetânicas sucessivas.

O músculo sóleo dos ratos diabéticos apresentou maior perda de força em relação ao controle. O tratamento de ratos diabéticos com NAC preveniu este desenvolvimento precoce de fadiga, enquanto o tratamento de ratos controle com o antioxidante garantiu maior manutenção da força durante as 10 contrações. O músculo EDL não apresentou alteração na resistência à fadiga nos grupos avaliados. Os resultados de no mínimo 8 observações estão apresentados como média $\pm$ EPM. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Figura 16 – Índice de fadiga (área sob a curva “força versus nº de contrações”) dos músculos sóleo e EDL nos quatro grupos experimentais.

O músculo sóleo de ratos diabéticos apresentou menor resistência à fadiga em relação ao controle, efeito que foi revertido pelo tratamento com NAC. Animais controles tratados com NAC apresentaram aumento da resistência à fadiga no músculo sóleo em comparação ao grupo controle. O músculo EDL não sofreu alteração na resistência à fadiga nos grupos avaliados. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 6 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

6.4 Conteúdo de glicogênio

O conteúdo de glicogênio nos músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos apresentou aumento de 2,4 e 2,7 vezes, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 17). O tratamento dos ratos controle e diabéticos com NAC não alterou esse parâmetro nos músculos estudados.

Figura 17 – Conteúdo de glicogênio nos músculos sóleo e EDL dos diferentes grupos avaliados.

Ratos diabéticos apresentaram maior conteúdo de glicogênio em ambos os músculos quando comparados ao controle. O tratamento com NAC não alterou este parâmetro. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

6.5 Conteúdo de VEGF, avaliado por ELISA, e HIF-1 α , avaliado por *western blotting*

Os músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos apresentaram diminuição de 43% e 55%, respectivamente, no conteúdo de VEGF (Figura 18) em relação ao controle. O tratamento de animais diabéticos com NAC atenuou a redução do conteúdo de VEGF no sóleo, 14% menor que o controle, porém, não apresentou efeito no EDL. A análise por *two-way* ANOVA destaca a existência de interação entre o estado diabético e o tratamento com o NAC ($p < 0,01$), que tem efeito oposto no sóleo dos ratos controles e diabéticos. Corroborando esta análise, o tratamento de animais controle com o antioxidante reduziu o conteúdo de VEGF no sóleo em 51%, sem apresentar efeitos no EDL.

Figura 18 – Conteúdo de VEGF avaliado por ELISA nos músculos sóleo e EDL nos quatro grupos experimentais.

Ratos diabéticos apresentaram redução no conteúdo de VEGF em ambos os músculos em relação ao controle. O tratamento de animais diabéticos com NAC recuperou o conteúdo de VEGF no músculo sóleo, enquanto que animais controle tratados com antioxidante apresentaram diminuição deste fator no mesmo músculo. O tratamento com NAC não apresentou efeito sobre o conteúdo de VEGF no músculo EDL. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular - *vascular endothelial growth factor*.

Os músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos apresentaram redução de 48% e 42%, respectivamente, no conteúdo de HIF-1 α em relação ao controle (Figura 19). O músculo EDL de ratos tratados com NAC não apresentou alteração desse parâmetro. Contudo, o músculo sóleo de ratos diabéticos tratados com o antioxidante apresentou uma tendência de recuperação do conteúdo de HIF-1 α , que se apresentou 12% menor que o controle. A análise por *two-way* ANOVA acusou tal tendência ($p=0,083$) de efeito do NAC no sóleo apesar do tratamento não ter apresentado efeito em ratos controle, reforçando a eficácia do NAC sobre a recuperação do conteúdo de HIF-1 α no sóleo de ratos diabéticos.

Figura 19 – Conteúdo de HIF-1 α nos músculos sóleo e EDL nos diferentes grupos estudados.

Observou-se redução de HIF-1 α em ambos os músculos dos animais diabéticos em comparação ao controle. O tratamento de ratos diabéticos com NAC apresentou tendência de recuperação do conteúdo do fator no músculo sóleo. No músculo EDL, o tratamento com antioxidante não alterou HIF-1 α . *Western Blots* normalizados pela carga total de proteína utilizada por amostra (*ponceau*). Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; HIF-1 α : fator induzido por hipóxia-1 alfa - *hypoxia-inducible factor-1 alpha*.

6.6 Conteúdo de SERCA1 e SERCA2 avaliado por *western blotting*

O músculo sóleo de ratos diabéticos apresentou redução de 58% no conteúdo de SERCA 1 em relação ao controle (Figura 20). O tratamento com NAC não alterou este parâmetro. O músculo EDL de ratos diabéticos apresentou conteúdo desta ATPase 2,3 vezes maior que no controle. Este aumento foi revertido pelo tratamento com NAC.

Figura 20 – Conteúdo de SERCA1 nos músculos sóleo e EDL nos quatro grupos experimentais.

Observou-se redução de SERCA1 no sóleo e aumento da mesma no EDL de ratos diabéticos em comparação ao controle. O tratamento com NAC não apresentou efeitos no sóleo, porém reverteu a elevação no conteúdo de SERCA1 ocorrido no EDL dos animais diabéticos. *Western Blots* normalizados pela carga total de proteína utilizada por amostra (*ponceau*). Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; SERCA1: ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático 1 - *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 1*.

O conteúdo de SERCA2 não foi alterado no músculo sóleo dos grupos experimentais (Figura 21). No músculo EDL, o conteúdo de SERCA2 apresentou-se 2,8 vezes maior nos ratos diabéticos, em relação ao controle, e o tratamento com NAC aboliu o aumento observado.

Figura 21 – Conteúdo de SERCA2 nos músculos sóleo e EDL dos quatro grupos avaliados.

Não se observou alteração do conteúdo de SERCA2 no músculo sóleo. O músculo EDL de ratos diabéticos apresentou aumento no conteúdo desta ATPase, que foi revertido pelo tratamento com NAC. *Western Blots* normalizados pela carga total de proteína utilizada por amostra (*ponceau*). Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; SERCA2: ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático 2 - *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 2*.

6.7 Conteúdo de PGC-1 α , COX IV, NRF2 e CPT1 avaliado por *western blotting*

O conteúdo de PGC-1 α apresentou-se reduzido em 69% no músculo sóleo dos ratos diabéticos em relação ao controle (Figura 22). A análise por *two-way* ANOVA indica a existência de interação entre o estado diabético e o tratamento com o NAC ($p < 0,05$), que tem efeito oposto no sóleo dos ratos controles e diabéticos. Corroborando esta análise, ratos diabéticos tratados com NAC apresentaram diminuição de apenas 35% no conteúdo de PGC-1 α no sóleo em comparação ao controle. Isto representa um aumento de 2 vezes em relação ao grupo diabético, demonstrando uma tendência de reversão parcial da redução observada nesse grupo. Por outro lado, o tratamento de animais controle com o antioxidante apresentou tendência de redução no conteúdo de PGC-1 α neste músculo, que se apresentou 32% menor que no grupo controle. Por sua vez, o músculo EDL de ratos diabéticos apresentou conteúdo de PGC-1 α 80% maior que no controle. O tratamento com NAC aboliu este aumento.

Figura 22 – Conteúdo de PGC-1 α nos músculos sóleo e EDL nos diferentes grupos estudados.

O conteúdo de PGC-1 α no músculo sóleo de ratos diabéticos apresentou-se reduzido quando comparado ao controle e o tratamento com NAC tende a reverter parcialmente este efeito. Animais controle tratados com NAC apresentaram tendência de diminuição no conteúdo deste coativador. O músculo EDL dos ratos diabéticos apresentou aumento no conteúdo de PGC-1 α , efeito que foi revertido pelo tratamento com NAC. *Western Blots* normalizados pela carga total de proteína utilizada por amostra (*ponceau*). Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; PGC-1 α : co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos -1alfa - *peroxisome proliferator- activated receptor gamma co-activator 1alpha*.

Observou-se redução de 58% no conteúdo de COX IV no sóleo de ratos diabéticos em comparação ao grupo controle (Figura 23). Da mesma maneira que o ocorrido com PGC-1 α , a análise por *two-way* ANOVA denota a existência de interação entre o estado diabético e o tratamento com o NAC ($p < 0,05$), que tem efeito oposto no sóleo dos ratos controles e diabéticos. De acordo com tal constatação, o tratamento de animais diabéticos com NAC apresentou tendência de recuperação deste parâmetro, que neste grupo foi apenas 24% menor em comparação ao controle. Isto representa um aumento de 82% em relação ao grupo diabético. Contudo, animais controles tratados com NAC apresentaram tendência de diminuição no conteúdo de COX IV no músculo sóleo, neste caso, 29% menor que no controle.

O músculo EDL de ratos diabéticos apresentou aumento de 55% no conteúdo de COX IV quando comparados aos controles. Este efeito foi atenuado pelo tratamento, já que no grupo diabético tratado com NAC este aumento foi de 22%. A análise por *two-way* ANOVA indicou uma tendência ($p = 0,077$) de efetividade do NAC no EDL apesar do tratamento não apresentar efeito em ratos controles, reforçando a eficácia do NAC na redução do conteúdo de COX IV no EDL de ratos diabéticos.

Figura 23 – Conteúdo de COX IV nos músculos sóleo e EDL dos diferentes grupos experimentais.

Observou-se redução de COX IV no músculo sóleo e aumento da mesma no músculo EDL de ratos diabéticos em relação ao controle. O tratamento de ratos diabéticos com NAC tende a restabelecer o conteúdo de COX IV para próximo dos valores do controle em ambos os músculos. No músculo sóleo, o tratamento de ratos controles com NAC apresentou tendência de diminuição do conteúdo de COX IV. *Western Blots* normalizados pela carga total de proteína utilizada por amostra (*ponceau*). Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; COX IV: citocromo c oxidase subunidade IV.

NRF2 não apresentou alteração de conteúdo nos músculos dos grupos experimentais estudados (Figura 24).

Figura 24 – Conteúdo de NRF2 nos músculos sóleo e EDL dos diferentes grupos estudados.

Não ocorreu modulação de NRF2 pelo estado diabético ou pelo tratamento com NAC. *Western Blots* normalizados pela carga total de proteína utilizada por amostra (*ponceau*). Os resultados de no mínimo 5 observações estão apresentados como média $\pm$ EPM. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; NRF2: fator respiratório nuclear 2 - *nuclear respiratory factor 2*.

O conteúdo de CPT1 não sofreu alteração no músculo sóleo dos grupos experimentais estudados (Figura 25). Porém, no músculo EDL de ratos diabéticos, o conteúdo desta transferase apresentou-se 32% maior quando comparado ao controle e o tratamento com NAC não causou efeito.

Figura 25 – Conteúdo de CPT1 nos músculos sóleo e EDL dos quatro grupos

avaliados.

O músculo sóleo não apresentou alterações no conteúdo de CPT1. O músculo EDL de ratos diabéticos apresentou aumento no conteúdo de CPT1 e o tratamento com NAC não alterou este parâmetro. *Western Blots* normalizados pela carga total de proteína utilizada por amostra (*ponceau*). Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 5 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1.

6.8 Expressão gênica de PPAR α , PPAR β e GLUT4 avaliada por RT-PCR

A expressão gênica de PPAR α no músculo sóleo de ratos diabéticos foi 45% menor que no controle, efeito revertido pelo tratamento com NAC (Figura 26). O mesmo tratamento em ratos controle aumentou a expressão desse gene no sóleo em 79%. No músculo EDL, não houve alteração na expressão de PPAR α .

Figura 26 – Expressão gênica de PPAR α nos músculos sóleo e EDL dos quatro grupos estudados.

O músculo sóleo de ratos diabéticos apresentou redução na expressão de PPAR α , efeito revertido pelo tratamento com NAC. O tratamento de ratos controle com o antioxidante aumentou a expressão do gene nesse músculo. O músculo EDL não apresentou alteração na expressão de PPAR α . A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; PPAR α : receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomos - *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

O músculo EDL de ratos diabéticos apresentou aumento de 2,3 vezes na expressão de PPAR β em comparação ao grupo controle, efeito revertido pelo tratamento com NAC (Figura 27). Ratos controle tratados com o antioxidante não apresentaram alteração na expressão desse gene no músculo EDL. O músculo sóleo não sofreu modificação na expressão gênica de PPAR β nos grupos experimentais estudados.

Figura 27 – Expressão gênica de PPAR β nos músculos sóleo e EDL dos quatro grupos avaliados.

O músculo EDL de ratos diabéticos apresentou aumento na expressão de PPAR β , efeito revertido pelo tratamento com NAC. O tratamento de ratos controle com o antioxidante não modificou a expressão do gene nesse músculo. O músculo sóleo não apresentou alteração na expressão de PPAR β . A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 5 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; PPAR β : receptor beta ativado por proliferadores de peroxissomos - *peroxisome proliferator-activated receptor beta*; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

A expressão gênica de GLUT4 em ratos diabéticos foi 38% e 43% menor nos músculos sóleo e EDL, respectivamente, em relação ao controle (Figura 28). Enquanto no músculo EDL o tratamento com NAC não alterou este parâmetro nos grupos estudados, no músculo sóleo, o tratamento recuperou a expressão de GLUT4 nos ratos diabéticos e a aumentou em 61% nos ratos controles.

Figura 28 – Expressão gênica de GLUT4 nos músculos sóleo e EDL dos quatro grupos estudados.

O estado de diabetes causou redução da expressão de GLUT4 em ambos os músculos. No músculo sóleo, o tratamento com NAC recuperou a expressão do gene em ratos diabéticos e aumentou sua expressão em ratos controles. No EDL, o tratamento não apresentou efeito. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 5 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; GLUT4: transportador de glicose 4 - *glucose transporter 4*; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

6.9 Expressão gênica de citrato sintase e SDH avaliada por RT-PCR

O músculo sóleo de ratos diabéticos apresentou redução de 40% na expressão gênica de citrato sintase (Figura 29). O tratamento de ratos diabéticos com NAC recuperou a expressão do gene em 75%, como atestado pela diferença estatisticamente significativa entre os grupos diabético e diabético + NAC (pós-teste de Bonferroni; $p < 0,05$). O sóleo de ratos controle tratados com NAC também apresentou aumento de 46% na expressão da citrato sintase. O músculo EDL não sofreu alteração deste parâmetro.

Figura 29 – Expressão gênica da citrato sintase nos músculos sóleo e EDL dos quatro grupos experimentais.

O músculo sóleo de ratos diabéticos apresentou redução na expressão de citrato sintase, efeito atenuado pelo tratamento com NAC. O músculo EDL não apresentou alteração na expressão do gene. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

O estado diabético não alterou a expressão de SDH no músculo sóleo, mas a reduziu em 52% no EDL (Figura 30). No sóleo, o tratamento com NAC aumentou a expressão do gene nos ratos controle e diabéticos em aproximadamente 40%. No EDL, o tratamento não apresentou efeito nos ratos diabéticos mas reduziu a expressão de SDH nos ratos controle em 36%.

Figura 30 – Expressão gênica de SDH nos músculos sóleo e EDL dos quatro grupos avaliados.

O músculo sóleo de ratos diabéticos não apresentou alteração na expressão de SDH, mas o tratamento com NAC aumentou sua expressão em ambos controle e diabéticos. No músculo EDL, o estado de diabetes reduziu a expressão de SDH e o tratamento com NAC não alterou este parâmetro. Ratos controle tratados com NAC também apresentaram redução na expressão desse gene no EDL. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média ± EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; SDH: succinato desidrogenase; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

6.10 Conteúdo de MURF1 e atrogina-1 avaliado por *western blotting*

Os conteúdos de atrogina-1 (Figura 31) e MURF1 (Figura 32) nos músculos sóleo e EDL não foram diferentes entre os grupos.

Figura 31 – Conteúdo de atrogina-1 nos músculos sóleo e EDL dos grupos

experimentais.

Não houve modulação de atrogina-1 pelo estado diabético nem pelo tratamento com NAC. *Western Blots* normalizados pela carga total de proteína utilizada por amostra (*ponceau*). Os resultados de no mínimo 5 observações estão apresentados como média $\pm$ EPM. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Figura 32 – Conteúdo de MURF1 nos músculos sóleo e EDL dos quatro grupos estudados.

Não se observou alteração no conteúdo de MURF1. *Western Blots* normalizados pela carga total de proteína utilizada por amostra (*ponceau*). Os resultados de no mínimo 5 observações estão apresentados como média $\pm$ EPM. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; MURF1: muscle RING-finger protein 1.

6.11 Razão fosfo-S6 / S6 total e fosfo-eIF2 α / eIF2 α total avaliada por *western blotting*

Em comparação ao grupo controle, os músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos apresentaram redução de 80% e 54%, respectivamente, no conteúdo de S6 fosforilada em relação ao conteúdo total de S6 (Figura 33). O tratamento de animais diabéticos com NAC reverteu parcialmente esta diminuição de fosforilação de S6 no músculo sóleo, neste caso, 23% menor que no grupo controle. O tratamento de animais controle com NAC reduziu a fosforilação de S6 em 55% no músculo EDL.

Figura 33 – Razão S6 fosforilada / S6 total nos músculos sóleo e EDL dos diferentes grupos experimentais.

Ambos os músculos estudados de ratos diabéticos apresentaram redução na razão S6 fosforilada / S6 total. O tratamento de animais diabéticos com NAC restabelece parcialmente a fosforilação de S6 no músculo sóleo mas não no EDL. Animais controle tratados com NAC também apresentaram redução da fosforilação de S6 no músculo EDL. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Não foi observada diferença na razão fosfo-eIF2 α / eIF2 α total nos grupos estudados em ambos os músculos sóleo e EDL (Figura 34).

Figura 34 – Razão fosfo-eIF2 α / eIF2 α total nos músculos sóleo e EDL dos grupos avaliados.

Não se observou alteração da razão fosfo-eIF2 α / eIF2 α total. Os resultados de no mínimo 4 observações estão apresentados como média $\pm$ EPM. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; eIF2 α : fator eucariótico de iniciação da tradução 2alfa - *eukaryotic translation initiation factor 2alpha*.

6.12 Expressão gênica de MyoD, Myf5, miogenina e PCNA avaliada por RT-PCR

A expressão gênica de MyoD não sofreu alteração nos músculos sóleo e EDL dos ratos diabéticos em relação ao controle (Figura 35). O tratamento com NAC alterou a expressão do gene apenas no sóleo de ratos controle, no qual ocorreu aumento de 82% em relação ao grupo controle.

Figura 35 – Expressão gênica de MyoD nos músculos sóleo e EDL dos grupos avaliados.

O diabetes não alterou a expressão de MyoD em nenhum dos músculos e o tratamento com NAC aumentou sua expressão no sóleo de ratos controle. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média ± EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; MyoD: fator de diferenciação miogênica - *myogenic differentiation factor*; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

O músculo sóleo não sofreu alteração na expressão gênica de Myf5, mas o músculo EDL de ratos diabéticos apresentou aumento de 89% na expressão deste gene (Figura 36). O tratamento de ratos diabéticos com NAC reduziu este aumento em 58%, como atestado pela diferença estatisticamente significativa entre os grupos diabético e diabético + NAC (pós-teste de Bonferroni; $p < 0,05$). Ratos controles tratados com o antioxidante não apresentaram alteração na expressão de Myf5.

Figura 36 – Expressão gênica de Myf5 nos músculos sóleo e EDL dos grupos estudados.

O músculo EDL de ratos diabéticos apresentou aumento na expressão de Myf5 e o tratamento com NAC atenuou este efeito. O músculo sóleo não apresentou alteração da expressão desse gene nos grupos avaliados. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 5 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; Myf5: fator miogênico 5 - *myogenic factor 5*; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

A expressão de miogenina no sóleo de ratos diabéticos sofreu diminuição de 77% em comparação ao grupo controle (Figura 37). O tratamento com NAC reverteu esta redução no sóleo dos ratos diabéticos e também causou aumento de 51% na expressão do gene em ratos controles. No músculo EDL a expressão de miogenina não foi alterada.

Figura 37 – Expressão gênica de miogenina nos músculos sóleo e EDL dos grupos estudados.

O músculo sóleo de ratos diabéticos apresentou redução na expressão de miogenina, efeito revertido pelo tratamento com NAC. O sóleo de ratos controle tratados com o antioxidante também apresentou aumento na expressão desse gene. O EDL não apresentou alteração na expressão de miogenina. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 5 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

A expressão gênica de PCNA não foi alterada em nenhum dos músculos ou grupos experimentais avaliados (Figura 38).

Figura 38 – Expressão gênica de PCNA nos músculos sóleo e EDL dos grupos experimentais.

Não ocorreu alteração na expressão de PCNA. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados de no mínimo 6 observações estão apresentados como média $\pm$ EPM. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular - *proliferating cell nuclear antigen*; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

6.13 Expressão gênica de IGF-1, miostatina e folistatina avaliada por qRT-PCR

Ratos diabéticos apresentaram redução de 42% e 48% na expressão gênica de IGF-1 nos músculos sóleo e EDL, respectivamente (Figura 39). O tratamento com NAC não alterou este parâmetro.

Figura 39 – Expressão gênica de IGF-1 nos músculos sóleo e EDL dos grupos avaliados.

Ocorreu redução na expressão de IGF-1 em ambos os músculos estudados nos ratos diabéticos. O tratamento com NAC não apresentou efeito. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média ± EPM) de no mínimo 5 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1 - *insulin-like growth factor-1*; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

A expressão gênica de miostatina no músculo sóleo foi semelhante entre ratos controles e diabéticos (Figura 40). O tratamento com NAC reduziu a expressão do gene em 78% no músculo sóleo em ratos controles, mas não apresentou efeito em ratos diabéticos. O estado diabético reduziu em 38% a expressão de miostatina no EDL (*two-way* ANOVA; $p < 0,05$). O tratamento com NAC foi efetivo (*two-way* ANOVA; $p < 0,01$) em aumentar a expressão do gene neste músculo em 68% em animais controles e em 86% em ratos diabéticos.

Figura 40 – Expressão gênica de miostatina nos músculos sóleo e EDL dos grupos experimentais.

O estado de diabetes não alterou a expressão de miostatina no músculo sóleo e o tratamento com NAC apresentou efeito apenas em ratos controle, reduzindo sua expressão. O músculo EDL de ratos diabéticos apresentou redução na expressão do gene. O tratamento com NAC elevou a expressão de miostatina neste músculo tanto em ratos controles como diabéticos. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

A expressão gênica de folistatina em ratos diabéticos foi 38% e 48% menor nos músculos sóleo e EDL, respectivamente, em relação ao controle (Figura 41). O tratamento com NAC não alterou este parâmetro em ratos diabéticos, porém causou redução de 37% na expressão do gene no sóleo e de 45% no EDL de ratos controle.

Figura 41 – Expressão gênica de folistatina nos músculos sóleo e EDL dos grupos avaliados.

Ratos diabéticos apresentaram redução na expressão de folistatina em ambos os músculos estudados e o tratamento com NAC não modificou este parâmetro. Ratos controles tratados com o antioxidante também apresentaram redução na expressão do gene em ambos os músculos. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média ± EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

6.14 Expressão gênica de fatores pró e anti-apoptóticos avaliada por RT-PCR

A razão da expressão gênica dos fatores pró (Bax) e anti-apoptóticos (Bcl-2) não sofreu alteração no músculo sóleo dos grupos analisados, mas o EDL de ratos diabéticos apresentou redução de 45% neste parâmetro (Figura 42). O tratamento com NAC não alterou este parâmetro nos ratos diabéticos, mas reduziu a razão em 36% nos ratos controles.

Figura 42 – Razão da expressão gênica de Bax e Bcl-2.

O músculo sóleo não sofreu alteração da razão Bax/Bcl-2. O músculo EDL de ratos diabéticos apresentou redução desta razão, que não foi afetada pelo tratamento com NAC. Ratos controles tratados com o antioxidante apresentaram redução desse parâmetro no músculo EDL. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o YWHAZ. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 6 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. Bax: *Bcl-2 associated X protein*; Bcl-2: *B-cell leukemia-2*; EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

6.15 Razão fosfo-AMPK α / AMPK α total avaliada por *western blotting*

A razão fosfo-AMPK α / AMPK α total dos músculos sóleo e EDL dos ratos diabéticos apresentou aumento de 2,1 e 2,3 vezes, respectivamente, quando comparada ao grupo controle (Figura 43). O tratamento de animais diabéticos com NAC reverteu esta elevação da fosforilação de AMPK α em ambos os músculos. Em ratos controle, o tratamento com NAC tendeu a reduzir a fosforilação de AMPK α no músculo EDL, embora a redução de 37% em relação ao controle não tenha sido detectada como significativa por *one-way* e *two-way* ANOVA. No sóleo, o mesmo tratamento não causou efeito neste parâmetro.

Figura 43 – Razão fosfo-AMPK α / AMPK α total nos músculos sóleo e EDL dos quatro grupos estudados.

Ambos os músculos estudados de ratos diabéticos apresentaram aumento na razão fosfo-AMPK α / AMPK α total. O tratamento dos animais diabéticos com NAC reverteu esta elevação em ambos os músculos. No músculo EDL de animais controles tratados com NAC, observou-se tendência de redução na fosforilação sofrida pela quinase. Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 5 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; AMPK α : proteína quinase alfa ativada por AMP - *AMP-activated protein kinase alpha*.

6.16 Conteúdo de desmina avaliado por *western blotting*

O músculo sóleo de ratos diabéticos não apresentou alteração significativa no conteúdo de desmina quando comparado ao controle, embora discreta redução (21%) tenha sido observada. O tratamento dos animais diabéticos com NAC aumentou em 61% o conteúdo de desmina no sóleo em relação ao grupo diabético (Figura 44). O músculo EDL de ratos diabéticos apresentou redução de 50% no conteúdo de desmina em relação ao controle. O tratamento com NAC não alterou este parâmetro.

Figura 44 – Conteúdo de desmina nos diferentes grupos experimentais.

O músculo sóleo de ratos diabéticos tratados com NAC apresentou elevação no conteúdo de desmina em relação ao grupo diabético. O músculo EDL dos animais diabéticos apresentou redução no conteúdo de desmina e o tratamento com NAC não alterou este parâmetro. *Western Blots* normalizados pela carga total de proteína utilizada por amostra (*ponceau*). Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

7 DISCUSSÃO

Os efeitos do diabetes induzido por estreptozotocina sobre o metabolismo e função do músculo esquelético de ratos foram estudados na presença e ausência do tratamento com NAC. Foram avaliados dois músculos esqueléticos: o sóleo, composto predominantemente de fibras tipo 1/oxidativas/contração lenta, e o EDL, composto predominantemente de fibras tipo 2/glicolíticas/contração rápida (Soukup et al., 2002). Estudou-se força, fadiga, propriedades contráteis do músculo e fatores relacionados à: biogênese e conteúdo mitocondrial, síntese e degradação de proteínas, miogênese, angiogênese e recaptação de cálcio. Os parâmetros eletrofisiológicos reobase e cronaxia não foram diferentes entre os grupos experimentais (Apêndice A), sugerindo a ausência de neuropatia periférica no modelo e período de diabetes adotados. Portanto, as alterações nas funções musculares, resumidas no Apêndice B, não estão associadas a esta condição.

7.1 Efeitos do estado diabético sobre os músculos sóleo e EDL de ratos

Os músculos sóleo e EDL desenvolvem diversas alterações em decorrência do quadro diabético (Tabela 3).

Tabela 3 – Alterações causadas pelo estado diabético nos músculos sóleo e EDL de ratos.

Diabético vs. Controle			
Sóleo		EDL

Liberação de H ₂ O ₂	Força isotônica absoluta	Liberação de H ₂ O ₂	Força isotônica absoluta
Glicogênio	Força tetânica absoluta	Catalase	Força tetânica absoluta
Fosfo-AMPKα / AMPKα total	GPX1	Força tetânica específica	GPX1
	SOD2	HRT	SOD2
	Tempo de sustentação da tetania	Glicogênio	HIF-1α
	Resistência à fadiga	SERCA1	VEGF
	HIF-1α	SERCA2	GLUT4
	VEGF	PGC-1α	SDH
	SERCA1	COX IV	Fosfo-S6 / S6 total
	PGC-1α	CPT1	Miostatina
	COX IV	PPARβ	Folistatina
	PPARα	Myf5	IGF-1
	GLUT4	Fosfo-AMPKα / AMPKα total	Bax / Bcl-2
	Citrato sintase		Desmina
	Fosfo-S6 / S6 total		
	Miogenina		
	Folistatina		
	IGF-1		

↑ = aumento, ↓ = redução

AMPKα: proteína quinase alfa ativada por AMP - *AMP-activated protein kinase alpha*; Bax: *Bcl-2-associated X protein*; Bcl-2: *B-cell leukemia / lymphoma 2*; COX IV: citocromo c oxidase subunidade IV; CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1; EDL: extensor digital longo; GLUT4: transportador de glicose 4 - *glucose transporter 4*; GPX1: glutational peroxidase 1; HIF-1α: fator induzido por hipóxia-1 alfa - *hypoxia-inducible factor-1 alpha*; HRT: *half relaxation time*; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1 - *insulin-like growth factor-1*; Myf5: fator miogênico 5 - *myogenic factor 5*; NAC: N-acetil-L-cisteína; PGC-1α: co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos -1alfa - *peroxisome proliferator- activated receptor gamma co-activator 1alpha*; PPARα e β: receptores alfa e beta ativado por proliferadores de peroxissomos - *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* e *beta*; SDH: succinato desidrogenase; SERCA1 e 2: ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático 1 e 2- *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 1* e *2*; SOD2: superóxido dismutase 2; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular - *vascular endothelial growth factor*.

No modelo de diabetes tipo 1 adotado, os músculos sóleo e EDL apresentaram conteúdo elevado de H_2O_2 , portanto, produção elevada de EROs. O H_2O_2 é considerado um sinalizador celular, pois é uma molécula relativamente estável e menos reativa que outras EROs. É pequena e não possui carga, podendo atravessar membranas, e, embora possa reagir com diversas moléculas, não é altamente lesiva (Ji, 2007). Porém, nossos dados refletem a produção geral de H_2O_2 na célula. É desejável que se identifique as fontes produtoras de EROs preponderantes do músculo esquelético durante o estado diabético, bem como os mecanismos antioxidantes comprometidos. Com isso, pode-se identificar especificamente enzimas, fatores e vias de sinalização modificados nos músculo esquelético de diabéticos.

Sóleo e EDL apresentaram redução na expressão gênica de GPX1 e SOD2, enquanto que SOD1 não sofreu alteração e a expressão de catalase aumentou no EDL dos ratos diabéticos. A expressão ou atividade das enzimas antioxidantes durante o diabetes exibem alterações que variam de acordo com o tecido avaliado (ex.: fígado, rins, coração cérebro, aorta) e a duração do quadro (Maritim et al., 2003). O mesmo ocorre no músculo esquelético, não havendo consenso na literatura sobre o comportamento das enzimas nessa condição. Há registro de aumento ou redução na atividade de GPX, SOD e catalase no músculo esquelético de ratos e coelhos mantidos diabéticos (indução por estreptozotocina ou aloxana) por período de 5 dias a 12 semanas de diabetes (De Angelis et al., 2000; Gumieniczek et al., 2001; Matsunami et al., 2009; Py et al., 2001). A menor expressão de GPX1 e SOD2 em ambos os músculos estudados é sugestiva de redução de sua capacidade antioxidante, tanto citoplasmática quanto mitocondrial, sendo um dos fatores que contribui para a ocorrência de estresse oxidativo no quadro diabético. A expressão mais elevada de catalase no EDL pode ser uma resposta ao estresse oxidativo.

Os músculos sóleo e EDL dos animais diabéticos apresentaram redução das forças isotônica e tetânica absolutas. A força isotônica específica não foi diferente entre os grupos em ambos os músculos. Portanto, a perda de força absoluta nesta situação se deve exclusivamente a hipotrofia muscular. Igualmente, a força tetânica específica do músculo sóleo não sofreu alteração. No músculo EDL, entretanto, os ratos diabéticos apresentaram aumento da força tetânica específica. Em revisão, Krause et al. (2011) discutiram os resultados discrepantes de aumento, redução ou ausência de modificação na força específica do músculo no estado diabético.

Diferenças na duração do estado diabético, a dose da droga diabetogênica usada, o tipo de fibra/músculo avaliado e o protocolo empregado para indução da contração podem explicar tais discrepâncias (Krause et al., 2011). Alterações no músculo esquelético induzidas pelo estado diabético levariam à redução da força, efeito oposto ao observado na força específica. Possivelmente, algum efeito compensatório sobrepõe-se à função muscular prejudicada e restabelece sua força. A dinâmica de liberação/recaptação de cálcio ou a sensibilidade do aparato contrátil a este íon podem estar envolvidas nesta resposta. A elevação da força tetânica específica ocorreu apenas no EDL de ratos diabéticos, músculo que apresentou aumento do tempo de relaxamento, um sinal de menor recaptação de cálcio. Então, é provável que uma alteração do transiente de cálcio, principalmente em decorrência de menor recaptação do íon, aumente seu conteúdo mioplásmico, acarretando em elevação de força específica no EDL.

O músculo sóleo dos ratos diabéticos não apresentou alterações de TTP e HRT, evidências de que não ocorreram modificações na velocidade de contração e relaxamento muscular. Confirmando esta observação, não ocorreu alteração no conteúdo de SERCA2, a isoforma predominante no músculo sóleo. Embora a expressão proteica de SERCA1 tenha se apresentado reduzida nesse músculo, tal diminuição pode não ter sido suficiente para alterar o relaxamento muscular. Em situações de maior produção do hormônio triiodotironina (T_3) ocorre aumento na expressão de SERCA1 e concomitante redução de SERCA2 em fibras musculares de contração lenta (Simonides et al., 2001). No estado diabético, com a redução do conteúdo plasmático de T_3 (Ortiz-Caro et al., 1984), efeito oposto pode ocorrer.

O músculo EDL dos ratos diabéticos apresentou aumento do HRT, sem modificações no TTP, indicando redução apenas da velocidade de relaxamento, sem alteração na sua velocidade de contração. O músculo tibial anterior de ratos diabéticos apresenta menor recaptação de cálcio (Eibschutz et al., 1984). Desta forma, a redução na velocidade de relaxamento observada no EDL pode estar associada a menor recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático durante a contração. Contraditoriamente, os conteúdos de SERCA1 e 2 estão aumentados no EDL dos ratos diabéticos. Estas ATPases possuem resíduos tióis que são afetados pelo estado redox celular e exposição a EROs (Andrade et al., 1998, 2001). Estas inibem a função de SERCA interferindo no sítio de ligação do trifosfato de adenosina (ATP), desacoplando a captação de cálcio da hidrólise deste (Scherer, Deamer,

1986). Isto pode resultar em aumento da concentração mioplásmica do íon (Westerblad, Allen, 1991), o que é observado no músculo esquelético em repouso de ratos diabéticos (Howarth et al., 2002; Nakagawa et al., 1989). De fato, o aumento na concentração de cálcio no mioplasma durante o repouso em fibras musculares expostas ao H_2O_2 está relacionado à deficiência na recaptação de cálcio (Andrade et al., 1998, 2001). O estresse oxidativo crônico sofrido pelo músculo pode acarretar em oxidações recorrentes e sucessivas de SERCA, causando alterações irreversíveis com a formação de resíduos sulfônicos, que levam à inativação definitiva da molécula (Adachi et al., 2004). Desta forma, o maior conteúdo das duas isoformas de SERCA representaria uma resposta compensatória à inativação, que mesmo assim não é suficiente para normalizar a recaptação do cálcio mioplásmico no músculo, acarretando em menor velocidade de relaxamento e aumento do HRT observado. Ratos diabéticos dependentes de insulina apresentam conversão das fibras musculares glicolíticas/contração rápida para o tipo oxidativo/contração lenta (Armstrong et al., 1975; Klueber et al., 1994), com perda de isomiosinas rápidas e aumento de isomiosinas lentas (Rutschmann et al., 1984), com menor atividade de ATPase (Unsworth et al., 1982). Este efeito pode também implicar em aumento na velocidade de relaxamento do músculo EDL.

O músculo esquelético de ratos diabéticos apresenta desorganização do sistema de túbulos-T e redução da densidade mitocondrial (Bonnard et al., 2008; Chao et al., 1976). Mitocôndrias do músculo de ratos diabéticos possuem número de cristas reduzido e menor densidade eletrônica na matriz (Bonnard et al., 2008; Chao et al., 1976). Estoques mais elevados de glicogênio nos músculos sóleo e EDL dos animais diabéticos, também foram observados por outros autores (Ferreira et al., 2001; Rauramaa et al., 1980). Contudo, o músculo sóleo dos animais diabéticos induzidos por estreptozotocina apresenta redução no conteúdo de ATP (Fewell, Moerland, 1995; Moore et al., 1983), fosfocreatina (Fewell, Moerland, 1995) e nas atividades de fosfofrutoquinase, citrato sintase e citocromo oxidase (Fewell, Moerland, 1995). Estes efeitos são diferentes de acordo com o músculo, já que tais alterações no ATP, fosfocreatina e atividade de enzimas não são observadas no EDL (Fewell, Moerland, 1995) desses animais. Isto pode estar relacionado com o fato de que o músculo EDL dos ratos diabéticos apresentou resistência à fadiga semelhante ao controle, enquanto que no sóleo observou-se fadiga precoce tanto no tempo de sustentação da tetania quanto na manutenção da força durante

10 contrações tetânicas. O músculo sóleo de ratos diabéticos é também mais susceptível à lesão induzida por contração tetânica que o EDL (Coprav et al., 2000). Isto pode ser consequência das alterações que o quadro diabético causa no metabolismo energético do sóleo, o que promoveria fadiga precoce, e músculos fatigados podem ser mais susceptíveis à lesão (Mair et al., 1996; Pinheiro et al., 2012).

A elevação da concentração de AGL no plasma que ocorre no diabetes (El Midaoui et al., 2006) pode estar relacionada ao aumento observado dos estoques de glicogênio nos músculos sóleo e EDL nesta condição. A maior oferta de ácidos graxos para o músculo por um período prolongado reduz o fluxo de metabólitos pela via glicolítica (Hirabara et al., 2007; Randle et al., 1963; Randle, 1998), o que pode causar acúmulo de glicogênio.

A expressão de PGC-1 α pode ser estimulada por estresse oxidativo (St-Pierre et al., 2006), ativação de AMPK e do elemento de ligação responsivo ao cAMP (CREB - *cAMP response element-binding*) (Handschin, Spiegelman et al., 2006). Este fator de transcrição também pode ser ativado através de vias sensíveis ao cálcio e AMP cíclico (cAMP), como a proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII - *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) e proteína quinase A (PKA), que estão ativadas em condições de deficiência de insulina (Mayr, Montminy, 2001). Apesar dos músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos apresentarem condições que levam a superexpressão de PGC-1 α por diversas vias, apenas no EDL ocorreu aumento do conteúdo de PGC-1 α , enquanto que no sóleo houve redução no conteúdo do coativador. Roberts-Wilson et al. (2010) demonstraram que a redução no conteúdo de PGC-1 α no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, apesar da ativação de outras vias que superexpressam PGC-1 α , deve-se a redução da sinalização da calcineurina, uma fosfatase dependente de cálcio associada ao estímulo à expressão de PGC-1 α . No músculo sóleo de ratos diabéticos, no qual não se observou alteração nos transientes de cálcio, ocorreria fenômeno semelhante ao do gastrocnêmio. No EDL destes animais, que apresentou evidências de aumento do cálcio mioplásmico em repouso, ocorreria ativação da via da calcineurina, levando ao aumento no conteúdo PGC-1 α .

A redução de PGC-1 α observada no sóleo dos ratos diabéticos sugere a ocorrência de menor biogênese mitocondrial (Handschin, Spiegelman et al., 2006), que poderia levar à redução no conteúdo de mitocôndrias no músculo. De fato, a menor expressão proteica de PGC-1 α foi acompanhada de redução do conteúdo de COX IV, indicativo de que o sóleo de ratos diabéticos apresenta menor conteúdo de mitocôndrias. Apesar disso, não ocorreu alteração no conteúdo de CPT1. Conclui-se que o músculo sóleo de ratos diabéticos apresenta redução do metabolismo energético, o que explicaria a menor resistência à fadiga observada.

Em concordância com os resultados observados para PGC-1 α e COX IV, a expressão gênica de PPAR α no sóleo foi menor em ratos diabéticos, enquanto não houve alteração na expressão de PPAR β . Os PPARs α e β são abundantes no músculo esquelético e sua ativação resulta na indução de genes que participam da regulação da oxidação de ácidos graxos (Gilde, Van Bilsen 2003; Leone et al. 1999; Muoio et al. 2002). O diafragma de camundongos nocaute para PPAR α apresenta comprometimento do metabolismo energético, sem alteração do perfil de tipos de fibras ou das cadeias pesadas de miosina (Lecarpentier et al., 2008). O estresse oxidativo do músculo no quadro diabético, portanto, parece reduzir a expressão de PPAR α no sóleo, sendo este mais um fator que contribuiria para o comprometimento do metabolismo energético nesse músculo.

A elevação do conteúdo de PGC-1 α no EDL de ratos diabéticos foi acompanhada de aumento de COX IV e CPT1, sendo indicativos da conversão do tipo de fibras no estado diabético, de glicolítica/contração rápida para oxidativa/contração lenta. Da mesma forma, a expressão gênica de PPAR β no EDL dos ratos diabéticos foi mais elevada que no grupo controle, enquanto a expressão de PPAR α não sofreu alteração nesse músculo. O PPAR β está associado à formação de fibras oxidativas/contração lenta (Luquet et al., 2003) e à conversão das fibras glicolíticas/contração rápida para oxidativas/contração lenta durante o treinamento de resistência (Wang et al., 2004). De fato, Salvi et al. (2010) observaram que, em comparação ao controle, o diafragma de ratos diabéticos apresenta redução de isoformas rápidas e aumento da isoforma lenta da cadeia pesada de miosina, bem como outras evidências da conversão para fibras oxidativas/contração lenta, como menor velocidade de contração. Tais efeitos coincidiam com uma expressão gênica e conteúdo proteico de PPAR β mais elevados no diafragma desses animais, sem alteração de PPAR α . Portanto, a

elevação na expressão de PPAR β no EDL de ratos diabéticos seria mais um fator associado à possível conversão de fibras que ocorre neste músculo na condição de diabetes.

Os músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos apresentaram redução na expressão gênica de GLUT4. Contrações musculares estimulam a translocação de GLUT4 para a membrana celular, aumentando a captação de glicose (Goodyear et al., 1991; Roy, Marette, 1996). Sendo o transporte da glicose através da membrana celular um dos principais fatores limitantes de sua utilização pelo músculo (Klip, Pâquet, 1990), a redução na expressão de GLUT4 durante o diabetes pode influenciar negativamente a disponibilidade deste substrato energético para o músculo durante as contrações. Este pode ser um dos fatores relacionados ao desenvolvimento precoce de fadiga no sóleo do rato diabético.

Foram analisadas também as enzimas citrato sintase e SDH, ambas componentes do ciclo de Krebs. A primeira catalisa uma das etapas limitantes do ciclo, a formação de citrato a partir de acetil-CoA e oxaloacetato. A segunda catalisa a conversão de succinato em fumarato, mas também compõe o complexo II da cadeia de transporte de elétrons, sendo aceptora dos elétrons provenientes da flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH₂). No músculo sóleo dos animais diabéticos, ocorreu redução da expressão gênica de citrato sintase, enquanto no EDL não houve alteração na expressão da enzima. Estes resultados estão de acordo com aqueles de Fewell e Moerland (1995), que observaram redução na atividade de citrato sintase no sóleo de ratos diabéticos, o que não ocorreu no EDL.

A expressão gênica de SDH não foi alterada no sóleo de ratos diabéticos, mas apresentou-se reduzida no EDL desses animais. No EDL de ratos diabéticos, apesar da existência de marcadores moleculares que indicam a conversão das fibras para um fenótipo mais oxidativo (maior expressão de PPAR β e maior conteúdo de PGC-1 α e COX IV), a enzima citrato sintase não apresentou alteração, enquanto SDH apresentou redução na sua expressão. Portanto, mesmo que o EDL sofra conversão para fibras oxidativas, a capacidade de oxidação de ácidos graxos dessas fibras ainda pode ser afetada pelo estresse oxidativo do diabetes, como será discutido, por mecanismos que vão desde inibição de atividade de enzimas limitantes do ciclo de Krebs, como a α -cetoglutarato desidrogenase, até alterações estruturais da mitocôndria.

Embora sóleo e EDL de ratos diabéticos tenham sofrido alteração de PGC-1 α , o conteúdo de NRF2, fator associado à biogênese mitocondrial (Bonnard et al., 2008) e expressão de enzimas antioxidantes (Surh et al., 2008; Zhu et al., 2005) e que pode ser modulado por PGC-1 α (Bonnard et al., 2008), se manteve inalterado. Camundongos com resistência à insulina induzida por dieta também apresentam redução de PGC-1 α no músculo esquelético sem sofrer alteração em NRF2 (Bonnard et al., 2008). Isto ocorre, pois a indução de NRF2 por PGC-1 α envolve a participação de outros cofatores de transcrição (Baar, 2004; Lin et al., 2002). Além disso, a estabilidade de NRF2 é modulada pela oxidação de grupos tióis de proteínas acessórias (Surh et al., 2008). Portanto, o conteúdo deste fator é definido pelo estado redox celular e pela interação entre diferentes proteínas que controlam sua expressão, sendo que apenas a alteração de PGC-1 α pode não ser suficiente para afetar o conteúdo de NRF2.

A sinalização redox é importante para a adaptação ao exercício físico. EROs atuam na modulação de vias de sinalização como MAPK e NF- κ B, que controlam a expressão de enzimas antioxidantes e fatores associados ao metabolismo energético (Gomez-Cabrera et al., 2005; Ji, 2008; Kang et al., 2009; Kramer, Goodyear, 2007). O tratamento com antioxidantes reduz a expressão induzida por exercício de PGC-1 α , PGC-1 β , receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR γ - *peroxisome proliferator- activated receptor gamma*), NRF1, fator de transcrição mitocondrial A (Tfam - *mitochondrial transcription factor A*), GPX e SOD1 e 2 (Kang et al., 2009; Ristow et al., 2009) no músculo esquelético humano. Em cultura primária de células musculares, o tratamento com NAC aboliu o aumento na produção de EROs induzida por contração, o que evitou o aumento da expressão de GLUT4, hexoquinase II e fosfofrutoquinase após a estimulação (Pinheiro et al., 2010). A adição de H₂O₂ ao meio de cultura aumentou a expressão desses três genes (Pinheiro et al., 2010). Os músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos apresentam conteúdo basal de EROs elevado, que não sofreu aumento subsequente mediante contração muscular. A ausência dessa sinalização redox desencadeada pelo exercício indica que ratos diabéticos podem ser menos susceptíveis às adaptações de defesa antioxidante e metabolismo energético induzidas pelo esforço físico.

O músculo esquelético de camundongos diabéticos apresenta menor angiogênese e densidade de capilares reduzida (Emanuelli et al., 2002; Kivelä et al., 2006). Este fato está associado à menor expressão de fatores proangiogênicos, como VEGF, e maior expressão de antiangiogênicos, como trombospondina-1 e *retinoblastoma like-2* (RBL2) (Kivelä et al., 2006). O estresse oxidativo está associado à disfunção endotelial, doenças vasculares e angiopatia (Johansen et al., 2005). A redução de PGC-1 α e HIF-1 α observada no sóleo de ratos diabéticos e de HIF-1 α no EDL destes animais foi acompanhada de diminuição no conteúdo de VEGF em ambos os músculos, o que está de acordo com o fato de que PGC-1 α e HIF-1 α estimulam a expressão de VEGF (Arany et al., 2008). A redução apresentada nos conteúdos de HIF-1 α e VEGF sugere menor capacidade de neovascularização nos músculos sóleo e EDL dos ratos diabéticos. As alterações na vascularização do músculo sóleo dos ratos diabéticos explicam parcialmente sua menor resistência à fadiga. Alteração vascular pode ser fator limitante durante contrações musculares, restringindo a oxigenação e consequentemente a produção de ATP na fosforilação oxidativa durante o estado diabético (Sun et al., 2008).

Os músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos apresentaram maior ativação de AMPK. No músculo sóleo, uma possível diminuição no conteúdo de ATP (Fewell, Moerland, 1995; Moore et al., 1983), associada à redução do metabolismo oxidativo de glicose e ácidos graxos pode ser a causa da ativação da quinase. No EDL dos ratos diabéticos, que não apresenta diminuição do conteúdo de ATP (Fewell, Moerland, 1995), mas sinais de aumento de cálcio mioplásmico, a ativação de AMPK poderia ocorrer via quinase da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKK - *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase*) (Witczak et al., 2008). O músculo epitroclear, que, assim como o EDL, é composto principalmente de fibras tipo 2/glicolíticas/contração rápida, quando incubado com H₂O₂, apresenta maior fosforilação de AMPK sem qualquer alteração em parâmetros ativadores da quinase, como AMP ou razão AMP/ATP (Toyoda et al., 2004). Isto indica que o estresse oxidativo sofrido pelos músculos pelo quadro de diabetes pode desencadear ativação de AMPK independente de AMP.

O conteúdo de atrofia-1 e MURF1, genes associados à hipotrofia muscular e degradação proteica via sistema ubiquitina-proteassomo (Bodine et al., 2001; Gomes et al., 2001) dos músculos sóleo e EDL não foi diferente entre os grupos. Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina apresentam proteólise elevada na

fase inicial (1 a 3 dias), tanto pela via dependente de Ca^{2+} , na qual se destacam as calpaínas, quanto pelo sistema ubiquitina-proteassomo (Pepato et al., 1996). Neste período, animais diabéticos também apresentam expressão elevada de atrogina-1 e MURF1 (Lecker et al., 2004). Porém, a degradação proteica volta a valores semelhantes ao controle 5 a 10 dias após indução do diabetes (Pepato et al., 1996), da mesma forma que a expressão de atrogina-1 e MURF1 (Mastrocola et al., 2008). Seguindo esta alteração, a razão entre a expressão das proteínas Bax (pró-apoptótica) e Bcl-2 (anti-apoptótica) foi similar ao controle no sóleo e menor no EDL dos ratos diabéticos. Este fato é indicativo de que após 4 semanas de diabetes não existe maior incidência de apoptose - e conseqüente proteólise - nestes músculos.

O músculo EDL dos ratos diabéticos sofreu proporcionalmente maior hipotrofia que o sóleo desses animais. A hipotrofia mais severa das fibras glicolíticas/contração rápida pode ser resultado do efeito dos glicocorticóides, uma vez que o conteúdo plasmático de corticosterona está elevado em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (Rhees et al., 1983) e estas são as fibras mais susceptíveis a ação catabólica desse hormônio (Goldberg, Goodman, 1969).

Ratos diabéticos apresentam diminuição extrema na secreção de insulina (Vitzel et al., 2013) e redução na concentração plasmática do hormônio de crescimento (Ortiz-Caro et al., 1984) com conseqüente diminuição de IGF-1 (Masaoka et al., 2003). No sóleo e no EDL, o diabetes reduziu a expressão gênica de IGF-1. A redução no conteúdo plasmático de insulina e IGF-1 acarreta em menor estímulo de síntese proteica dos músculos sóleo e EDL dos animais diabéticos pela via proteína quinase B (AKT ou PKB)/ *mammalian target of rapamycin* (mTOR)/p70S6K (p70S6 quinase)/S6K (S6 quinase) (Glass, 2005; Sandri, 2008), o que foi constatado pela redução observada na fosforilação de S6. Assim, a síntese proteica muscular de ratos diabéticos se mantém reduzida desde a fase inicial da doença (Pepato et al., 1996). A fosforilação de eIF2 α , que leva à inibição de eIF2B e da iniciação da transcrição e, portanto, da síntese proteica (Price, Proud, 1994; Proud, 2005), não foi modificada nos músculos sóleo e EDL do grupo diabético.

A miostatina é um membro da família do fator transformador de crescimento-beta (TGF- β - *transforming growth factor-beta*) que atua no controle da massa muscular (McPherron et al., 1997). Este fator inibe a expressão de fatores de regulação da miogênese (MRFs - *myogenic regulatory factors*) e a diferenciação miogênica (Liu et al., 2001), ativando ubiquitina ligases e a proteólise via

proteassomo (Lokireddy et al., 2011; Sartori et al., 2009), inibindo a síntese proteica pela via AKT ou PKB/mTOR/p70S6K (Trendelenburg et al., 2009). A folistatina promove hipertrofia muscular ao inibir a miostatina (Lee, McPherron, 2001) e estimular a síntese proteica pela via AKT ou PKB/mTOR/S6K (Winbanks et al., 2012). A expressão gênica da miostatina não sofreu alteração no sóleo e foi menor no EDL dos animais diabéticos, indicando que a alteração de sua expressão não é um fator determinante da hipotrofia muscular no diabetes. Porém, a menor expressão de folistatina observada em ambos os músculos avaliados dos ratos diabéticos indica redução do estímulo à síntese proteica muscular e menor repressão à ação hipotrófica da miostatina, podendo este ser mais um mecanismo determinante para a redução de massa do músculo em estado diabético.

O PCNA é uma proteína envolvida na replicação do DNA e apresenta expressão mais elevada na fase S do ciclo celular, sendo um marcador da entrada da célula em ciclo proliferativo (Johnson, Allen, 1993). Myf5, MyoD e miogenina são fatores de regulação miogênica. O primeiro promove proliferação e auto-renovação de progenitores miogênicos (Chargé, Rudnicki, 2004; Gayraud-Morel et al., 2007; Ustanina et al., 2007). O segundo é necessário para progressão da diferenciação desses progenitores (Chargé, Rudnicki, 2004; Cornelison et al., 2000; Sabourin et al., 1999). O terceiro é necessário para formação de miotubos e fibras musculares (Knapp et al., 2006). As únicas alterações na expressão gênica desses fatores induzidas pelo diabetes foram o aumento de Myf5 no EDL e a redução de miogenina no sóleo. Sendo assim, parece não ocorrer modificações pronunciadas em marcadores associados à proliferação e diferenciação de progenitores musculares no sóleo e EDL de ratos diabéticos. Isto indica, inicialmente, que não ocorrem alterações em sua ativação ou propriedades miogênicas após 4 semanas de diabetes, não sendo este um componente que contribuiria para a hipotrofia característica do quadro. Apenas a redução de miogenina no sóleo seria uma alteração importante, visto que camundongos que expressam miogenina recombinante apresentam massa muscular reduzida (Knapp et al., 2006). Portanto, a ausência de miogenina pode diminuir a diferenciação de progenitores miogênicos, atenuando a contribuição dos mioblastos no crescimento muscular.

Estresse oxidativo e citocinas, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α - *tumor necrosis factor-alpha*), podem ativar a via clássica do NF- κ B (Bakkar, Guttridge, 2010; Li et al., 1998). Durante a regeneração muscular, a ativação dessa

via estaria associada às fases iniciais do processo regenerativo, estimulando a proliferação e inibindo a diferenciação de progenitores miogênicos (Hyldahl et al., 2013). Portanto, a ativação de NF- κ B poderia ser uma das vias que modula a alteração na expressão de MRFs no músculo de ratos diabéticos. Contudo, embora o modelo murino de diabetes induzido por estreptozotocina apresente estresse oxidativo muscular e conteúdo plasmático elevado de citocinas, como interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e TNF- α (Palsamy, Subramanian, 2010), não ocorre ativação da via clássica do NF- κ B nos músculos sóleo e EDL desses animais (Kelleher et al., 2010). Porém, sua ativação em progenitores miogênicos precisa ser investigada.

O marcador sarcomérico desmina apresentou-se reduzido no músculo EDL dos ratos diabéticos, evidência da hipotrofia sofrida. No sóleo destes animais, o conteúdo de desmina apresentou uma tendência discreta de redução, embora o músculo tenha apresentado massa bem menor em relação ao controle. Isso provavelmente se deve ao fato de que o músculo sóleo dos ratos diabéticos apresenta redução da quantidade, mas não do diâmetro das fibras (Hegarty, Rosholt, 1981). As fibras em si não sofrem hipotrofia, permanecendo com a mesma quantidade de sarcômeros e, assim, mantendo proporcionalmente o mesmo conteúdo de desmina que o músculo do controle.

7.2 Efeitos do tratamento com NAC sobre os músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos

O tratamento dos animais diabéticos com NAC por 5 dias aboliu a maior liberação de H₂O₂ em ambos os músculos estudados e promoveu alterações diferentes em cada um deles (Tabela 4). Este efeito foi observado 24 horas após a última injeção do antioxidante. O tratamento, apesar de utilizar uma dose de NAC mais baixa que a adotada por outros autores (Pinheiro et al., 2012; van der Laan et al., 1997), foi eficiente na redução do conteúdo de EROs do músculo esquelético induzida pelo estado diabético.

Tabela 4 – Alterações causadas pelo tratamento com NAC nos músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos.

Diabético + NAC vs. Diabético			
Sóleo		EDL

GPX1	Liberação de H ₂ O ₂	Miostatina	Liberação de H ₂ O ₂
SOD2	Fosfo-AMPKα / AMPKα total		Catalase
Tempo de sustentação da tetania			HRT
Resistência à fadiga			SERCA1
HIF-1α			SERCA2
VEGF			PGC-1α
PGC-1α			COX IV
COX IV			PPARβ
PPARα			Myf5
GLUT4			Fosfo-AMPKα / AMPKα total
SDH			
Citrato sintase			
Fosfo-S6 / S6 total			
Miogenina			
Desmina			

↑ = aumento, ↓ = redução

AMPKα: proteína quinase alfa ativada por AMP - *AMP-activated protein kinase alpha*; COX IV: citocromo c oxidase subunidade IV; EDL: extensor digital longo; GLUT4: transportador de glicose 4 - *glucose transporter 4*; GPX1: glutathione peroxidase 1; HIF-1α: fator induzido por hipóxia-1 alfa - *hypoxia-inducible factor-1 alpha*; HRT: *half relaxation time*; Myf5: fator miogênico 5 - *myogenic factor 5*; NAC: N-acetil-L-cisteína; PGC-1α: co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos -1alfa - *peroxisome proliferator- activated receptor gamma co-activator 1alpha*; PPARα e β: receptores alfa e beta ativado por proliferadores de peroxissomos - *peroxisome proliferator-activated receptor alpha e beta*; SDH: succinato desidrogenase; SERCA1 e 2: ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático 1 e 2- *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 1 e 2*; SOD2: superóxido dismutase 2; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular - *vascular endothelial growth factor*.

No sóleo de ratos diabéticos, o antioxidante recuperou a expressão de GPX1 e SOD2, podendo ser este um dos mecanismos mediadores de seu efeito de reversão do estresse oxidativo. No EDL, o tratamento não apresentou efeitos sobre a expressão de GPX1 e SOD2, que se manteve reduzida no grupo tratado, embora a produção elevada de EROs também tenha sido abolida neste grupo. A redução do conteúdo de H₂O₂ pelo tratamento pode ter sido acompanhada por diminuição da expressão de catalase.

O tratamento dos ratos diabéticos com NAC reverteu a elevação do HRT no EDL, demonstrando que a alteração no relaxamento deste músculo sofre influência do estresse oxidativo. A ação do antioxidante pode envolver recuperação da atividade de SERCA, inativada por oxidações irreversíveis em situação de estresse oxidativo crônico (Adachi et al., 2004), ou do conteúdo de fibras glicolíticas/contração rápida no EDL dos ratos diabéticos, que sofrem conversão para fibras oxidativas/contração lenta nesta condição (Armstrong et al., 1975; Klueber et al., 1994). Concomitantemente, o tratamento com NAC reverteu a elevação do conteúdo proteico de SERCA no EDL de ratos diabéticos, que ocorreria como resposta compensatória de sua menor atividade.

O exercício físico induz a formação de EROs no músculo esquelético (Bejma, Ji, 1999; Davies et al., 1982; Jackson et al., 1985; McArdle et al., 2001; Pinheiro et al., 2012; Powers, Lennon et al., 1999; Reid, 2001;), resultando em estresse oxidativo (Belviranli et al., 2006; Davies et al., 1982; Radák et al., 1999; Reid, 2001). O conteúdo de EROs está associado à fadiga muscular (Barclay, Hansel, 1991; Ji et al., 2007; Novelli et al., 1990; Powers, Jackson, 2008; Powers, Lennon et al., 1999; Reid, 2001). O tratamento com NAC em ratos controles preveniu a elevação do conteúdo de H_2O_2 durante o protocolo de contrações do músculo sóleo, aumentando a resistência à fadiga do músculo.

Estresse oxidativo prolongado ou severo pode ocorrer durante contrações musculares, diminuindo a sensibilidade miofibrilar ao cálcio (Andrade et al., 1998; Moopanar, Allen, 2005; Murphy et al., 2008), alterando a ligação deste a troponina C (Plant et al., 2000), o que reduz a força muscular e a velocidade de contração. EROs inibem a bomba Na^+/K^+ (McKenna et al., 2006), diminuindo a excitabilidade (Juel, 2006) e a força. EROs também modulam RyR1, que é ativado por oxidações leves e reversíveis (Hidalgo et al., 2006; Zissimopoulos, Lai, 2006), mas, da mesma forma que SERCA, é inativado por oxidações recorrentes e irreversíveis (Zissimopoulos, Lai, 2006). Com isso, altera-se a liberação e recaptção de cálcio no músculo esquelético, modificando o transiente de cálcio (Benders et al., 1997; Lesniewski et al., 2003) durante as contrações, que se torna menor e mais lento (Benders et al., 1997), possivelmente reduzindo a força (Westerblad, Allen, 1991) e as velocidades de contração e relaxamento musculares. O estresse oxidativo reduz também as atividades da aconitase e α -cetoglutarato desidrogenase (Andersson et al., 1998), limitando a geração de NAD(P)H pelo ciclo de Krebs (Tretter, Adam-Vizi, 2005).

Componentes da cadeia de transporte de elétrons, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e creatina quinase mitocondrial e citossólica também são passíveis de modulação redox (Clanton et al., 1999). Fosfofrutoquinase, piruvato quinase, hexoquinase e glicogênio fosforilase fosfatase são inativadas pelo tratamento com GSSG e outros dissulfetos biológicos (Gilbert, 1982). Essas modificações na atividade enzimática comprometem a oxidação de glicose e ácidos graxos, reduzindo a força muscular durante contrações.

Modificações estruturais e na função da mitocôndria, observadas no diabetes, são associadas ao estresse oxidativo. Células musculares em cultura expostas ao H_2O_2 apresentam alteração da morfologia mitocondrial, redução do potencial da membrana mitocondrial interna e da taxa respiratória máxima (Fan et al., 2010). Nestas células, ocorre também redução da atividade da citrato sintase e da expressão de PGC-1 α , que são restauradas pelo tratamento com NAC (Bonnard et al., 2008). Camundongos com deficiência da SOD2 no músculo esquelético (muscle-Sod2^{-/-}) apresentam redução do conteúdo de ATP e da atividade dos complexos I e II da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Kuwahara et al., 2010). Estas alterações estão relacionadas ao estresse oxidativo no camundongo mutante, já que o tratamento com antioxidantes restaura o conteúdo muscular de ATP, indicativo de proteção da função mitocondrial (Kuwahara et al., 2010). A redução da densidade e integridade mitocondriais observada no músculo esquelético de animais diabéticos também é restaurada pelo tratamento com NAC (Bonnard et al., 2008).

O protocolo de contração por estimulação elétrica causou maior liberação de EROs pelos músculos sóleo e EDL e o tratamento com NAC preveniu este efeito em animais controles e diabéticos. Ratos diabéticos apresentaram liberação elevada de EROs no músculo esquelético desde o início da estimulação elétrica. Em animais diabéticos (e também em controles), o tratamento com o antioxidante aumentou a resistência à fadiga no músculo sóleo. Ratos diabéticos tratados com NAC tiveram desempenho indistinguível, em relação aos controles, nos protocolos de fadiga executados. Este resultado é sugestivo de que o conteúdo elevado de EROs está envolvido no estabelecimento precoce da fadiga no músculo sóleo dos ratos diabéticos.

O tratamento com NAC pode agir atenuando os efeitos negativos das EROs na excitabilidade, metabolismo energético e nos transientes de cálcio e sensibilidade ao íon durante a contração muscular. O tratamento também pode restaurar as alterações na função mitocondrial e no metabolismo energético associadas ao estresse oxidativo e diabetes que comprometem a função do músculo, mesmo antes da estimulação elétrica.

O músculo sóleo de ratos diabéticos é mais susceptível à lesão induzida por contração tetânica que o EDL (Coprav et al., 2000). Como já foi demonstrado que o NAC reduz a fadiga muscular (Medved et al., 2004; Pinheiro et al., 2012; Powers, Jackson 2008; Reid et al., 1994) e atenua a lesão induzida por contração (Pinheiro et al., 2012), este pode ser outro mecanismo pelo qual o efeito do NAC no protocolo de fadiga foi mais pronunciado no músculo sóleo.

O tratamento de ratos diabéticos com NAC recuperou o conteúdo de PGC-1 α e COX IV e a expressão gênica de PPAR α e citrato sintase no sóleo, restabelecendo a resistência à fadiga. Em conjunto, esses resultados são indicativos de que o estresse oxidativo participa da redução da capacidade oxidativa e da biogênese e conteúdo mitocondrial, sendo um dos fatores associados ao comprometimento do metabolismo energético do músculo esquelético no rato diabético, o que leva à intolerância ao exercício físico.

O tratamento de ratos diabéticos com NAC restabelece o conteúdo de PGC-1 α e COX IV (mas não de CPT1) e a expressão gênica de PPAR β para próximo do controle no músculo EDL, sugestivo de que o estresse oxidativo é um dos fatores associados à conversão do tipo de fibras.

A expressão gênica de GLUT4 apresentou-se reduzida nos músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos, efeito revertido pelo tratamento com NAC apenas no primeiro. Portanto, o quadro diabético diminui a expressão deste gene em ambos os músculos estudados, mas o estresse oxidativo estaria relacionado a este efeito apenas no sóleo. O aumento proporcionado pelo NAC na expressão gênica de GLUT4 neste músculo de ratos diabéticos pode ser outro mecanismo pelo qual o tratamento aumenta a sua resistência à fadiga.

O tratamento com NAC aumentou a expressão de SDH no sóleo, em diabéticos, sendo mais um dos indícios de aumento da capacidade de oxidação de ácidos graxos do músculo pelo tratamento. No EDL, o tratamento não modificou sua expressão em ratos diabéticos.

O tratamento de ratos diabéticos com NAC não apresentou efeito sobre HIF-1 α e VEGF no EDL, porém recuperou o conteúdo desses no sóleo, associado também ao aumento de PGC-1 α neste músculo, indicando melhora da sua capacidade de neovascularização. Os efeitos positivos do tratamento com NAC sobre marcadores de neovascularização no sóleo pode ser um dos fatores ligados a melhora da tolerância do músculo ao exercício.

A maior ativação de AMPK nos músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos foi atenuada pelo tratamento com NAC. As evidências de recuperação do metabolismo energético no sóleo dos ratos diabéticos pelo antioxidante poderiam estar associadas a uma possível redução do estresse metabólico e recuperação do conteúdo de ATP, o que diminuiria a ativação de AMPK no músculo. No EDL, o tratamento com NAC diminuiu a ativação de AMPK melhorando a recaptação de cálcio no músculo, reduzindo a concentração mioplásmica do cátion e, por consequência, a ativação de CaMKK. Assim, o controle do estresse oxidativo pelo NAC pode reverter uma possível ativação de AMPK no músculo de ratos diabéticos através de mecanismo induzido por EROs independentemente da razão AMP/ATP (Toyoda et al., 2004).

Apesar das evidências que associam as EROs à ocorrência de degradação proteica (Bonetto et al., 2009; Mastrocola et al., 2008; Powers et al., 2007), o tratamento com NAC ocorre em um período no qual o músculo esquelético do rato diabético já não sofre mais proteólise elevada (Mastrocola et al., 2008; Pepato et al., 1996), não apresentando efeito sobre este parâmetro. Desta forma, a massa seca do sóleo e EDL dos ratos diabéticos tratados com NAC não é diferente dos não tratados, mantendo-se menor que a dos controles.

O tratamento de ratos diabéticos com NAC restabeleceu parcialmente a fosforilação de S6 no músculo sóleo, mas não no EDL. Este restabelecimento pode estar associado à diminuição da ativação de AMPK observada no sóleo do animal diabético tratado com NAC, o que diminuiria a inibição da via AKT ou PKB/mTOR/S6K por AMPK (Bolster et al., 2002).

O músculo sóleo de ratos diabéticos apresentou redução na expressão gênica de miogenina, enquanto no EDL observou-se aumento na expressão de Myf5. Ambos os efeitos foram revertidos pelo tratamento com NAC, indicando que o estresse oxidativo está associado às alterações na expressão de MRFs, assim como observado por Aragno et al. (2004). Nesse trabalho, o músculo gastrocnêmio de

ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina apresentou redução de massa e do conteúdo de MyoD e miogenina, além de menor expressão de creatina quinase e das cadeias leve e pesada de miosina. O tratamento, desde o início do diabetes, com vitamina E ou deidroepiandrosterona, ambos antioxidantes, preservou a massa muscular e preveniu a redução no conteúdo dessas proteínas (Aragno et al., 2004). Estes resultados são indicativos da participação do estresse oxidativo no processo de hipotrofia muscular no diabetes, com possível efeito deletério também na regeneração (Aragno et al., 2004), associado à alteração na expressão de MRFs. A diferença de resultado entre os dois trabalhos pode ser decorrência dos antioxidantes utilizados ou mesmo dos modelos e duração dos tratamentos. No presente trabalho, o tratamento durou 5 dias, após 3 semanas de diabetes e ocorrência de estresse oxidativo e no de Aragno et al. (2004), começou tão logo o quadro diabético, mantido por 3 semanas, foi estabelecido. Desta forma, a contribuição das alterações na expressão de MRFs para a perda de massa muscular no rato diabético ainda é incerta. No presente trabalho elas foram revertidas pelo tratamento com NAC, mas a massa muscular de ambos os músculos estudados não foi recuperada. Outros agentes estimuladores da síntese proteica, como insulina, IGF-1 e folistatina permaneceram reduzidos, mesmo após o tratamento com NAC. Portanto, a recuperação isolada da expressão de miogenina no sóleo pode não ser suficiente para reverter a hipotrofia, embora sua contribuição para o quadro não possa ser descartada.

Progenitores miogênicos são importantes para regeneração, hipertrofia e manutenção da massa muscular (Brack, Rando, 2012). São heterogêneos, com diferentes origens, expressão gênica específica e propensão à diferenciação miogênica ou não miogênica distintas (Yin et al., 2013). O potencial regenerativo destas células pode sofrer grande influência do microambiente no qual elas estão inseridas (Yin et al., 2013). Conforme revisado por Yin et al. (2013), sinais bioquímicos e estruturais compõem este microambiente, como moléculas difusíveis (ex.: Wnt, IGF e fator de crescimento de fibroblasto – FGF - *fibroblast growth factor*) produzidas pelas células musculares, componentes de matriz extracelular, interação entre receptores celulares, neurônios motores, células imunes e hormônios circulantes. Esses sinais em conjunto atuam na manutenção da quiescência ou promoção da ativação dos progenitores musculares.

Esse microambiente sofre inúmeras alterações no animal diabético. Por exemplo, além da diminuição de insulina (Vitzel et al., 2013) e do conteúdo de IGF-1 plasmático (Masaoka et al., 2003), foi observada redução na expressão de IGF-1 nos músculos sóleo e EDL dos ratos diabéticos, efeito que não foi alterado pelo tratamento com NAC. Este hormônio é importante para proliferação e diferenciação de células satélites (Yin et al., 2013). Outra alteração observada no microambiente muscular do animal diabético é a ocorrência de estresse oxidativo. Porém, a maneira como este microambiente do rato diabético interfere na miogênese e o impacto disto na massa muscular requer investigações, tanto no estado basal, quanto na já conhecida regeneração muscular deficiente em diabéticos. As alterações discretas na expressão gênica do marcador de proliferação celular PCNA e dos MRFs nos músculos sóleo e EDL de ratos diabéticos, e a ausência de efeitos tróficos após a reversão destas alterações pelo tratamento com NAC, sugerem que não há associação entre modificações na ativação de progenitores miogênicos e redução da massa destes músculos, ao menos durante o período de 4 semanas de diabetes. A única exceção é a redução da expressão gênica de miogenina no sóleo de ratos diabéticos, que, como discutido previamente, pode ser um fator relacionado à hipotrofia desse músculo. Resultados do laboratório ainda não publicados denotam redução do conteúdo de progenitores miogênicos no músculo EDL de ratos após 4 semanas de diabetes. Neste músculo, observa-se também redução da incorporação de células progenitoras na fibra muscular, tanto em estado basal quanto em situação de hipertrofia por sobrecarga. Portanto, o microambiente muscular pode, nos primeiros dias de diabetes, quando ocorre menor síntese proteica e proteólise elevada (Pepato et al., 1996), estimular a quebra da quiescência e ativação de células satélites. Isto causaria depleção na população de progenitores musculares, que, após 4 semanas, pode refletir em menor incorporação dessas células em fibras musculares, participando assim da manutenção da hipotrofia do músculo do rato diabético, sem necessariamente sofrer alterações na sua capacidade miogênica. Situação semelhante ocorre durante o envelhecimento (Chakkalakal et al., 2012; Le Grand, Rudnicki, 2007) e a ocorrência de tal evento deve ser verificada no diabetes. A modulação de outros fatores reguladores da miogênese, como, por exemplo, as vias de Wnt e Notch, também deve ser investigada, uma vez que a cultura primária de células satélites de ratos diabéticos apresentou menor capacidade de fusão emmiotubos (Brannon et al., 1989), evidência do comprometimento da miogênese

mesmo fora do microambiente alterado do músculo do rato diabético. A capacidade de ligação ao sítio MEF-1 (do inglês *muscle enhancer factor-1*) do DNA (uma sequência a qual se ligam MRFs e que é fundamental para a expressão de alguns genes específicos de músculo esquelético) é reduzida em ratos diabéticos e o estresse oxidativo é um dos mediadores deste efeito (Aragno et al.,2004). Portanto, outros mecanismos, além da modulação da expressão dos MRFs, também comprometem a miogênese no diabetes.

O aumento no conteúdo de desmina do sóleo do rato diabético tratado com NAC pode estar associado ao aumento da fosforilação de S6, parâmetro de estímulo à síntese proteica, ou mesmo ao aumento na expressão de miogenina. Apesar disso, este estímulo não foi suficiente para reduzir a hipotrofia do músculo, ou o tempo de tratamento não foi suficientemente longo para causar mudança da massa muscular. Este resultado pode significar uma ação permissiva do NAC ao crescimento muscular em situação de estímulo hipertrófico ou regenerativo do sóleo de ratos diabéticos.

7.3 Efeitos do tratamento com NAC sobre os músculos sóleo e EDL de ratos controles

O tratamento com NAC apresentou efeitos nos músculos sóleo e EDL (Tabela 5) que podem ser independentes da modulação de EROs, uma vez que o antioxidante não alterou o conteúdo basal de H_2O_2 nos músculos estudados de ratos controles. O aumento da resistência à fadiga no músculo sóleo e da força tetânica no EDL são exceções, pois estes parâmetros são avaliados durante contração, situação em que o tratamento evitou a elevação na liberação de H_2O_2 .

Aumento na expressão de GPX1, SOD2 e catalase foi observado no sóleo de ratos controles tratados com NAC. Apesar disso, não ocorreu redução, abaixo do valor de controle, na produção de H_2O_2 . Portanto, esse pode ser um efeito específico do NAC, que ocorre apenas no sóleo, dissociado de qualquer modulação do estado redox. A expressão mais elevada dessas enzimas no sóleo dos animais controles aumentou a capacidade antioxidante e possivelmente a resistência à fadiga.

No EDL de ratos controles, o tratamento com o antioxidante aumentou a força tetânica específica, e, por consequência, a força tetânica absoluta. O aumento da força nesta situação de liberação máxima de cálcio pode ocorrer por diversos fatores, como aumento na quantidade de miofibrilas ou na concentração mioplasmática de cálcio, maior sensibilidade miofibrilar e da troponina C ao íon e maior quantidade de ATP, mas o mecanismo pelo qual o NAC atua nesta situação ainda não foi elucidado.

Tabela 5 – Alterações causadas pelo tratamento com NAC nos músculos sóleo e EDL de ratos controles.

NAC vs. Controle			
Sóleo		EDL

GPX1	VEGF	Força tetânica absoluta	SDH
SOD2	PGC-1 α	Força tetânica específica	Fosfo-S6 / S6 total
Catalase	COX IV	Miostatina	Folistatina
Resistência à fadiga	Miostatina		Bax / Bcl-2
PPAR α	Folistatina		Fosfo-AMPK α / AMPK α total
GLUT4			
SDH			
Citrato sintase			
MyoD			
Miogenina			

↑ = aumento, ↓ = redução

AMPK α : proteína quinase alfa ativada por AMP - *AMP-activated protein kinase alpha*; Bax: *Bcl-2-associated X protein*; Bcl-2: *B-cell leukemia / lymphoma 2*; COX IV: citocromo c oxidase subunidade IV; EDL: extensor digital longo; GLUT4: transportador de glicose 4 - *glucose transporter 4*; GPX1: glutationa peroxidase 1; MyoD: fator de diferenciação miogênica - *myogenic differentiation factor*; NAC: N-acetil-L-cisteína; PGC-1 α : co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos -1alfa - *peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha*; PPAR α : receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomos - *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*; SDH: succinato desidrogenase; SOD2: superóxido dismutase 2; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular - *vascular endothelial growth factor*.

O tratamento de animais controle com NAC causou menor perda de força durante as dez contrações tetânicas no sóleo, demonstrando o envolvimento das EROs na fadiga muscular, como discutido anteriormente. Esses dados confirmam os de outros trabalhos em que a suplementação com antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (Barclay, Hansel, 1991; Powers, Jackson, 2008; Reid, 2001), incluindo o

NAC (Medved et al., 2004; Pinheiro et al., 2012; Powers, Jackson 2008; Reid et al., 1994), retardou a fadiga durante contração muscular.

O músculo sóleo de ratos controles tratados com NAC também apresentou diminuição do conteúdo de VEGF e tendência de redução do conteúdo de PGC-1 α e COX IV. A modulação do estado redox celular por NAC nesta situação poderia influenciar o metabolismo energético do músculo. O tratamento com NAC apresenta efeitos opostos sobre esses parâmetros no sóleo de ratos controles e diabéticos. Isso provavelmente ocorreu porque no primeiro caso, NAC pode interferir em um padrão fisiológico de produção e depleção de EROs, enquanto no segundo caso o antioxidante age revertendo um estresse oxidativo patológico para valores semelhantes ao controle.

O tratamento com NAC também elevou a expressão gênica de PPAR α , GLUT4, citrato sintase e SDH no sóleo de ratos controles, sugerindo a ocorrência de uma ação própria do antioxidante sobre a expressão destes genes. Esta maior expressão também pode estar associada ao aumento da resistência à fadiga observada no sóleo destes animais.

No músculo EDL, o tratamento reduziu a expressão de SDH em ratos controles, sem alterá-la nos diabéticos. Este padrão de resposta demonstra que a expressão da enzima não sofre modulação pelo estresse oxidativo, mas o tratamento com NAC apresenta efeito sobre este parâmetro independente da modulação de EROs.

O tratamento com o antioxidante reduziu a fosforilação de S6 no músculo EDL de ratos controles. EROs em concentrações fisiológicas são importantes na sinalização da insulina, inibindo reversivelmente fosfatases de tirosina (Loh et al., 2009). Nessa condição, o tratamento com NAC pode diminuir a sinalização insulínica no músculo EDL, reduzindo a fosforilação de S6 pela via AKT ou PKB/mTOR/S6K. O mesmo efeito também pode ser devido à redução da expressão gênica de folistatina e aumento de miostatina induzidos pelo tratamento.

Apesar do NAC não ter alterado a expressão gênica de folistatina em ratos diabéticos, em ratos controles o tratamento reduziu sua expressão em ambos os músculos. A expressão de miostatina no EDL dos animais diabéticos foi recuperada pelo tratamento com o antioxidante, o que aparentemente independe da modulação de EROs, uma vez que o EDL de ratos controles tratados com NAC também apresentou expressão mais elevada deste gene. Este efeito foi oposto ao observado

no sóleo do grupo controle com o mesmo tratamento, que apresentou redução na expressão de miostatina. Sendo assim, o efeito do NAC sobre a expressão gênica de miostatina e folistatina não depende de alteração na produção de H_2O_2 e é específico para cada músculo. O tratamento com o antioxidante sobre o EDL reduz a fosforilação de S6, eleva a expressão de miogenina e diminui a de folistatina. Em conjunto, tais alterações são indicativas de um efeito inibitório do NAC sobre o crescimento do músculo EDL. Apesar disso, não ocorreu alteração de sua massa após os 5 dias de tratamento. A administração do NAC por períodos mais prolongados ou mesmo estímulo hipertrófico ou regenerativo durante o tratamento podem ajudar a elucidar a importância de tais alterações moleculares sobre o trofismo desse músculo.

O tratamento de ratos controles com NAC também aumentou a expressão de MyoD e miogenina no músculo sóleo e, portanto, o efeito do antioxidante sobre a expressão destes genes pode não estar associado à modulação redox. Da mesma forma que nos animais diabéticos, a alteração da expressão dos MRFs não alterou a massa muscular. O significado dessa elevação em condição basal (ratos controles, sem estímulo de hipertrofia ou injúria) e sua influência na capacidade regenerativa ainda são incertos, embora uma ativação crônica de progenitores possa contribuir para a redução da população destes e da capacidade miogênica do músculo, como ocorre no envelhecimento (Chakkalakal et al., 2012; Le Grand, Rudnicki, 2007). Por outro lado, antioxidantes como o NAC podem apresentar efeitos positivos na regeneração por aumentarem a sobrevivência de células-tronco musculares em situações de estresse oxidativo e inflamatório (Drowley et al., 2010), como ocorre em casos de lesão.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os músculos sóleo (predominância de fibras tipo 1/oxidativas/contração lenta) e EDL (predominância de fibras tipo 2/glicolíticas/contração rápida) de ratos apresentam alterações específicas em decorrência do quadro de diabetes dependente de insulina induzido por administração de estreptozotocina.

Nos ratos com diabetes, constatou-se a ocorrência de estresse oxidativo em ambos os músculos estudados, o que foi abolido pelo tratamento com NAC. Concomitantemente, observou-se a reversão (total ou parcial) de muitas das alterações observadas, indicativo de que o estresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento ou manutenção de várias delas. Porém, o NAC apresentou também efeitos em ratos controles, apesar destes não apresentarem evidências de modificação do estado redox, e efeitos comuns sobre animais controles e diabéticos.

O tratamento de ratos diabéticos com NAC reduziu a produção de H_2O_2 durante contrações e retardou o desenvolvimento de fadiga no músculo sóleo. Recuperou também a expressão de diversos marcadores da capacidade oxidativa, biogênese e conteúdo mitocondrial e angiogênese (HIF-1 α , VEGF, PGC-1 α e COX IV). Porém, alguns desses marcadores (PPAR α , SDH, citrato sintase e GLUT4) também apresentaram expressão elevada no sóleo de ratos controles tratados com o antioxidante. Portanto, a fadiga precoce e o comprometimento do metabolismo energético do músculo sóleo na vigência de diabetes estão associados ao estresse oxidativo observado. Parte do efeito positivo do NAC sobre o metabolismo energético no músculo esquelético é do próprio agente antioxidante, não estando relacionado ao controle do estresse oxidativo (Figura 45).

Figura 45 – Alterações na expressão gênica ou conteúdo de proteínas causadas pelo tratamento com NAC no sóleo de ratos controles e diabéticos.

O tratamento com o antioxidante aboliu o estresse oxidativo sofrido pelo músculo sóleo no quadro de diabetes, mas não causou modulação redox em ratos controles. Efeitos do tratamento exclusivos de ratos diabéticos são indicativos da participação do estresse oxidativo nessas alterações. Aqueles ocorridos apenas em ratos controles teriam menor envolvimento das EROs. Os efeitos do NAC comuns aos dois grupos sofreriam influência parcial / inconclusiva do estresse oxidativo. AMPKα: proteína quinase alfa ativada por AMP - *AMP-activated protein kinase alpha*; COX IV: citocromo c oxidase subunidade IV; EROs: espécies reativas de oxigênio; GLUT4: transportador de glicose 4 - *glucose transporter 4*; GPX1: glutatona peroxidase 1; HIF-1α: fator induzido por hipóxia-1 alfa - *hypoxia-inducible factor-1 alpha*; MyoD: fator de diferenciação miogênica - *myogenic differentiation factor*; NAC: N-acetil-L-cisteína; PGC-1α: co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos -1alfa - *peroxisome proliferator- activated receptor gamma co-activator 1alpha*; PPARα: receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomos - *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*; SDH: succinato desidrogenase; SOD2: superóxido dismutase 2; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular - *vascular endothelial growth factor*.

No EDL, o tratamento de ratos diabéticos com NAC reduziu para valores próximos do controle o conteúdo proteico de PGC-1α, COX IV e a expressão gênica de PPARβ, indicando diminuição na ocorrência de conversão de fibras glicolíticas/contração rápida para oxidativas/contração lenta. A velocidade de relaxamento também foi restabelecida, como observado pela redução do HRT,

sugerindo que a capacidade de recaptação de cálcio foi restaurada. Portanto, o estresse oxidativo do músculo EDL de ratos diabéticos estaria envolvido na conversão de fibras glicolíticas/contração rápida para oxidativas/contração lenta e no comprometimento da recaptação de cálcio (Figura 46).

Figura 46 – Alterações na expressão gênica ou conteúdo de proteínas causadas pelo tratamento com NAC no EDL de ratos controles e diabéticos.

O tratamento com o antioxidante aboliu o estresse oxidativo sofrido pelo músculo EDL no quadro de diabetes, mas não causou modulação redox em ratos controles. Efeitos do tratamento exclusivos de ratos diabéticos são indicativos da participação do estresse oxidativo nessas alterações. Aqueles ocorridos apenas em ratos controles teriam menor envolvimento das EROs. Os efeitos do NAC comuns aos dois grupos sofreriam influência parcial / inconclusiva do estresse oxidativo. AMPKα: proteína quinase alfa ativada por AMP - *AMP-activated protein kinase alpha*; Bax: *Bcl-2-associated X protein*; Bcl-2: *B-cell leukemia / lymphoma 2*; COX IV: citocromo c oxidase subunidade IV; EDL: extensor digital longo; EROs: espécies reativas de oxigênio; HRT: *half relaxation time*; Myf5: fator miogênico 5 - *myogenic factor 5*; NAC: N-acetil-L-cisteína; PGC-1α: co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos -1alfa - *peroxisome proliferator- activated receptor gamma co-activator 1alpha*; PPARβ: receptor alfa beta ativado por proliferadores de peroxissomos - *peroxisome proliferator-activated receptor beta*; SDH: succinato desidrogenase; SERCA1 e 2: ATPases de cálcio do retículo sarcoplasmático 1 e 2- *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 1 e 2*.

9 CONCLUSÃO

O estresse oxidativo que acomete o músculo esquelético no quadro de diabetes é parte integrante do desenvolvimento ou manutenção das alterações decorrentes da doença, e que são específicas para cada tipo muscular. Tendo origem multifatorial, apenas o controle do estresse oxidativo por antioxidantes não abole completamente estas alterações, mas pode gerar um ambiente permissivo para as intervenções convencionais.

REFERÊNCIAS¹

- Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schöneich C, Cohen RA. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med*. 2004 Nov;10(11):1200-7. Epub 2004 Oct 17.
- Andersson U, Leighton B, Young ME, Blomstrand E, Newsholme EA. Inactivation of aconitase and oxoglutarate dehydrogenase in skeletal muscle in vitro by superoxide anions and/or nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Aug 19;249(2):512-6.
- Andrade FH, Reid MB, Allen DG, Westerblad H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J Physiol*. 1998 Jun 1;509 (Pt 2):565-75.
- Andrade FH, Reid MB, Westerblad H. Contractile response of skeletal muscle to low peroxide concentrations: myofibrillar calcium sensitivity as a likely target for redox-modulation. *FASEB J*. 2001 Feb;15(2):309-11. Epub 2000 Dec 8.
- Aragno M, Mastrocola R, Catalano MG, Brignardello E, Danni O, Boccuzzi G. Oxidative stress impairs skeletal muscle repair in diabetic rats. *Diabetes*. 2004 Apr;53(4):1082-8.
- Arany Z, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala SM, Baek KH, Rosenzweig A, Spiegelman BM. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature*. 2008 Feb 21;451(7181):1008-12.
- Armstrong RB, Gollnick PD, Ianuzzo CD. Histochemical properties of skeletal muscle fibers in streptozotocin-diabetic rats. *Cell Tissue Res*. 1975 Oct 13;162(3):387-94.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*. 1989;6(6):593-7.
- Atkinson MA. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Nov 1;2(11). pii: a007641.
- Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta*. 2006;368:1-19.
- Baar K. Involvement of PPAR gamma co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR alpha in the adaptive response to endurance exercise. *Proc Nutr Soc*. 2004 May;63(2):269-73.
- Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 2004 Feb;16(1):42-7.

¹De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Bakkar N, Guttridge DC. NF-kappaB signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. *Physiol Rev*. 2010 Apr;90(2):495-511.

Barclay JK, Hansel M. Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991 Feb;69(2):279-84.

Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:19-37.

Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991 Apr;40(4):405-12.

Bejma J, Ji LL. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1999 Jul;87(1):465-70.

Bellin C, de Wiza DH, Wiernsperger NF, Rösen P. Generation of reactive oxygen species by endothelial and smooth muscle cells: influence of hyperglycemia and metformin. *Horm Metab Res*. 2006 Nov;38(11):732-9.

Belviranli M, Gökbel H. Acute exercise induced oxidative stress and antioxidant changes. *Eur J Gen Med*. 2006;3(3):126-31.

Benders AA, Oosterhof A, Wevers RA, Veerkamp JH. Excitation-contraction coupling of cultured human skeletal muscle cells and the relation between basal cytosolic Ca²⁺ and excitability. *Cell Calcium*. 1997 Jan;21(1):81-91.

Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Nov-Dec;7(11-12):1553-67.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001 Nov 23;294(5547):1704-8. Epub 2001 Oct 25.

Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem*. 2002 Jul 5;277(27):23977-80. Epub 2002 May 7.

Bonetto A, Penna F, Muscaritoli M, Minero VG, Rossi Fanelli F, Baccino FM, Costelli P. Are antioxidants useful for treating skeletal muscle atrophy? *Free Radic Biol Med*. 2009 Oct 1;47(7):906-16. Epub 2009 Jul 8.

Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaux E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest*. 2008 Feb;118(2):789-800.

Brack AS, Rando TA. Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell. *Cell Stem Cell*. 2012 May 4;10(5):504-14.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

Brannon MA, Dodson MV, Wheeler BA, Mathison BD, Mathison BA. Satellite cells derived from streptozotocin-diabetic rats display altered fusion parameters in vitro. *Metabolism*. 1989 Apr;38(4):348-52.

Bravard A, Bonnard C, Durand A, Chauvin MA, Favier R, Vidal H, Rieusset J. Inhibition of xanthine oxidase reduces hyperglycemia-induced oxidative stress and improves mitochondrial alterations in skeletal muscle of diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011 Mar;300(3):E581-91. Epub 2011 Jan 11.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414:813-20.

Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE. IKK β /NF- κ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*. 2004 Oct 15;119(2):285-98.

Chakkalakal JV, Jones KM, Basson MA, Brack AS. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature*. 2012 Oct 18;490(7420):355-60. Epub 2012 Sep 26.

Chao TT, Ianuzzo CD, Armstrong RB, Albright JT, Anapolle SE. Ultrastructural alterations in skeletal muscle fibers of streptozotocin-diabetic rats. *Cell Tissue Res*. 1976 May 6;168(2):239-46.

Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004 Jan;84(1):209-38.

Clanton TL, Zuo L, Klawitter P. Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999 Dec;222(3):253-62.

Copray S, Liem R, Brouwer N, Greenhaff P, Habens F, Fernyhough P. Contraction-induced muscle fiber damage is increased in soleus muscle of streptozotocin-diabetic rats and is associated with elevated expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in muscle fibers and activated satellite cells. *Exp Neurol*. 2000 Feb;161(2):597-608.

Cornelison DD, Olwin BB, Rudnicki MA, Wold BJ. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol*. 2000 Aug 15;224(2):122-37.

Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer HG. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic Biol Med*. 2004 Nov 15;37(10):1511-26.

Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982 Aug 31;107(4):1198-205.

De Angelis K, Senna S, Irigoyen MC, Cestari IA. Diabetes-induced alterations in latissimus dorsi muscle properties impair effectiveness of dynamic cardiomyoplasty in rats. *Artif Organs*. 2004 Apr;28(4):326-31.

De Angelis KL, Cestari IA, Barp J, Dall'Ago P, Fernandes TG, de Bittencourt PI, Belló-Klein A, Belló AA, Llesuy S, Irigoyen MC. Oxidative stress in the latissimus dorsi muscle of diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*. 2000 Nov;33(11):1363-8.

Demasi M, Silva GM, Netto LE. 20 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. *J Biol Chem*. 2003 Jan 3;278(1):679-85. Epub 2002 Oct 29.

Drowley L, Okada M, Beckman S, Vella J, Keller B, Tobita K, Huard J. Cellular antioxidant levels influence muscle stem cell therapy. *Mol Ther*. 2010 Oct;18(10):1865-73. Epub 2010 Jul 27.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005; 365:1415-28.

Eibschutz B, Lopaschuk GD, McNeill JH, Katz S. Ca²⁺-transport in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum of the chronically diabetic rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1984 Aug;45(2):301-4.

El Midaoui A, Chiasson JL, Tancrède G, Nadeau A. Physical training reverses the increased activity of the hepatic ketone body synthesis pathway in chronically diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Feb;290(2):E207-12.

Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Stacca T, Milia AF, Spano A, Chao J, Chao L, Sciola L, Madeddu P. Prevention of diabetes-induced microangiopathy by human tissue kallikrein gene transfer. *Circulation*. 2002 Aug 20;106(8):993-9.

Fan X, Hussien R, Brooks GA. H₂O₂-induced mitochondrial fragmentation in C2C12 myocytes. *Free Radic Biol Med*. 2010 Dec 1;49(11):1646-54. Epub 2010 Aug 27.

Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Interv*. 2005 Apr;5(2):94-111.

Favero TG, Zable AC, Abramson JJ. Hydrogen peroxide stimulates the Ca²⁺ release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1995 Oct 27;270(43):25557-63.

Ferreira LD, Bräu L, Nikolovski S, Raja G, Palmer TN, Fournier PA. Effect of streptozotocin-induced diabetes on glycogen resynthesis in fasted rats post-high-intensity exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Jan;280(1):E83-91.

Ferreira LF, Reid MB. Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. *J Appl Physiol*. 2008 Mar;104(3):853-60. Epub 2007 Nov 15.

Fewell JG, Moerland TS. Responses of mouse fast and slow skeletal muscle to streptozotocin diabetes: myosin isoenzymes and phosphorous metabolites. *Mol Cell Biochem*. 1995 Jul 19;148(2):147-54.

Gale EA. Type 1 diabetes in the young: the harvest of sorrow goes on. *Diabetologia*. 2005 Aug;48(8):1435-8.

Gayraud-Morel B, Chrétien F, Flamant P, Gomès D, Zammit PS, Tajbakhsh S. A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Dev Biol*. 2007 Dec 1;312(1):13-28. Epub 2007 Sep 11.

Gilbert HF. Biological disulfides: the third messenger? Modulation of phosphofructokinase activity by thiol/disulfide exchange. *J Biol Chem*. 1982 Oct 25;257(20):12086-91.

Gilde AJ, Van Bilsen M. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2003 Aug;178(4):425-34.

Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Oct;37(10):1974-84.

Goldberg AL, Goodman HM. Relationship between cortisone and muscle work in determining muscle size. *J Physiol*. 1969 Feb;200(3):667-75.

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 4;98(25):14440-5. Epub 2001 Nov 20.

Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardó FV, Sastre J, Ji LL, Viña J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*. 2005 Aug 15;567(Pt 1):113-20. Epub 2005 Jun 2.

Goodyear LJ, Hirshman MF, Horton ES. Exercise-induced translocation of skeletal muscle glucose transporters. *Am J Physiol*. 1991 Dec;261(6 Pt 1):E795-9.

Gumieniczek A, Hopkała H, Wójtowicz Z, Nieradko M. Differences in antioxidant status in skeletal muscle tissue in experimental diabetes. *Clin Chim Acta*. 2001 Dec;314(1-2):39-45.

Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY, Baldwin AS Jr. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science*. 2000 Sep 29;289(5488):2363-6.

Halvatsiotis P, Short KR, Bigelow M, Nair KS. Synthesis rate of muscle proteins, muscle functions, and amino acid kinetics in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 Aug;51(8):2395-404.

Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev.* 2006 Dec;27(7):728-35. Epub 2006 Oct 3.

Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 1992 Jun;6(9):2675-83.

Hebert SL, Nair KS. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. *Clin Nutr.* 2010 Feb;29(1):13-7. Epub 2009 Sep 27.

Hegarty PV, Rosholt MN. Effects of streptozotocin-induced diabetes on the number and diameter of fibres in different skeletal muscles of the rat. *J Anat.* 1981 Sep;133(Pt 2):205-11.

Hidalgo C, Sánchez G, Barrientos G, Aracena-Parks P. A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S -glutathionylation. *J Biol Chem.* 2006 Sep 8;281(36):26473-82. Epub 2006 Jun 8.

Hirabara SM, Silveira LR, Abdulkader F, Carvalho CRO, Procopio J, Curi R. Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. *J of cell physiol.* 2007; 210:7-15.

Howarth FC, Glover L, Culligan K, Qureshi MA, Ohlendieck K. Calsequestrin expression and calcium binding is increased in streptozotocin-induced diabetic rat skeletal muscle though not in cardiac muscle. *Pflugers Arch.* 2002 May;444(1-2):52-8. Epub 2002 Feb 7.

Hyldahl RD, Schwartz LM, Clarkson PM. NF-KB activity functions in primary pericytes in a cell- and non-cell-autonomous manner to affect myotube formation. *Muscle Nerve.* 2013 Apr;47(4):522-31. Epub 2013 Jan 31.

Jackson MJ, Edwards RH, Symons MC. Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Nov 20;847(2):185-90.

Jellinger PS. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. *Clin Cornerstone.* 2007;8 Suppl 7:S30-42.

Ji LL. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol.* 2007 Jul;42(7):582-93. Epub 2007 Mar 21.

Ji LL. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 2008 Jan 15;44(2):142-52. Epub 2007 Mar 12.

Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol.* 2005 Apr 29;4(1):5.

- Johnson SE, Allen RE. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is expressed in activated rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol.* 1993 Jan;154(1):39-43.
- Juel C. Muscle fatigue and reactive oxygen species. *J Physiol.* 2006 Oct 1;576(Pt 1):1. Epub 2006 Aug 10.
- Kang C, O'Moore KM, Dickman JR, Ji LL. Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha signaling is redox sensitive. *Free Radic Biol Med.* 2009 Nov 15;47(10):1394-400. Epub 2009 Aug 14.
- Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care.* 2000 Oct;23(10):1516-26.
- Kelleher AR, Fairchild TJ, Keslacy S. STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF- κ B canonical cascade activation. *Acta Diabetol.* 2010 Dec;47(4):315-23. Epub 2010 Jul 17.
- Keppler, D. and Decker, K. Glycogen determination with amyloglucosidase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis.* New York: Academic Press; 1974. vol. 3. p. 1127-31.
- Kivelä R, Silvennoinen M, Touvra AM, Lehti TM, Kainulainen H, Vihko V. Effects of experimental type 1 diabetes and exercise training on angiogenic gene expression and capillarization in skeletal muscle. *FASEB J.* 2006 Jul;20(9):1570-2.
- Klip A, Pâquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care.* 1990 Mar;13(3):228-43.
- Klueber KM, Feczko JD. Ultrastructural, histochemical, and morphometric analysis of skeletal muscle in a murine model of type I diabetes. *Anat Rec.* 1994 May;239(1):18-34.
- Knapp JR, Davie JK, Myer A, Meadows E, Olson EN, Klein WH. Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size. *Development.* 2006 Feb;133(4):601-10. Epub 2006 Jan 11.
- Kraegen EW, Cooney GJ. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Curr Opin Lipidol.* 2008; 19:235–41.
- Kramer HF, Goodyear LJ. Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2007 Jul;103(1):388-95. Epub 2007 Feb 15.
- Krause MP, Riddell MC, Gordon CS, Imam SA, Cafarelli E, Hawke TJ. Diabetic myopathy differs between Ins2Akita+/- and streptozotocin-induced Type 1 diabetic models. *J Appl Physiol.* 2009 May;106(5):1650-9. Epub 2009 Feb 26.
- Krause MP, Riddell MC, Hawke TJ. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatr Diabetes.* 2011 Jun;12(4 Pt 1):345-64. Epub 2010 Sep 22.

Krishnamurthy N, Balakumar B, Thombre DP. Acute effects of experimental diabetes on skeletal muscle contractile functions. *Clin Physiol Biochem*. 1992;9(4):119-23.

Kuwahara H, Horie T, Ishikawa S, Tsuda C, Kawakami S, Noda Y, Kaneko T, Tahara S, Tachibana T, Okabe M, Melki J, Takano R, Toda T, Morikawa D, Nojiri H, Kurosawa H, Shirasawa T, Shimizu T. Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. *Free Radic Biol Med*. 2010 May 1;48(9):1252-62. Epub 2010 Feb 13.

Le Grand F, Rudnicki MA. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Dec;19(6):628-33. Epub 2007 Nov 8.

Lecarpentier Y, Krokidis X, Martin P, Pineau T, Hébert JL, Quillard J, Cortes-Morichetti M, Coirault C. Increased entropy production in diaphragm muscle of PPAR alpha knockout mice. *J Theor Biol*. 2008 Jan 7;250(1):92-102. Epub 2007 Sep 21.

Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J*. 2004 Jan;18(1):39-51.

Lecker SH, Salomon V, Price SR, Kwon YT, Mitch WE, Goldberg AL. Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. *J Clin Invest*. 1999; 104:1411-20.

Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9306-11. Epub 2001 Jul 17.

Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 22;96(13):7473-8.

Lesniewski LA, Miller TA, Armstrong RB. Mechanisms of force loss in diabetic mouse skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 2003 Oct;28(4):493-500.

Li YP, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR, Reid MB. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB J*. 1998 Jul;12(10):871-80.

Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem*. 2002 Jan 18;277(3):1645-8. Epub 2001 Nov 30.

Liu D, Black BL, Derynck R. TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev*. 2001 Nov 15;15(22):2950-66.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Ljubisavljevic M, Qureshi A, Nagelkerke N. The effects of neuropeptide Y on skeletal muscle contractile properties in streptozotocin diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 2010 Jan;333(1-2):27-32. Epub 2009 Jul 19.

Loh K, Deng H, Fukushima A, Cai X, Boivin B, Galic S, Bruce C, Shields BJ, Skiba B, Ooms LM, Stepto N, Wu B, Mitchell CA, Tonks NK, Watt MJ, Febbraio MA, Crack PJ, Andrikopoulos S, Tiganis T. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab*. 2009 Oct;10(4):260-72.

Lokireddy S, McFarlane C, Ge X, Zhang H, Sze SK, Sharma M, Kambadur R. Myostatin induces degradation of sarcomeric proteins through a Smad3 signaling mechanism during skeletal muscle wasting. *Mol Endocrinol*. 2011 Nov;25(11):1936-49. Epub 2011 Sep 29.

Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1776-83.

Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Rassoulzadegan M, Grimaldi PA. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J*. 2003 Dec;17(15):2299-301. Epub 2003 Oct 2.

Maccarrone M, Ullrich V. Redox regulation in disease and ageing. *Cell Death Differ*. 2004 Aug;11(8):949-51.

Mair SD, Seaber AV, Glisson RR, Garrett WE Jr. The role of fatigue in susceptibility to acute muscle strain injury. *Am J Sports Med*. 1996 Mar-Apr;24(2):137-43.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):24-38.

Masaoka T, Suzuki H, Hosoda H, Ota T, Minegishi Y, Nagata H, Kangawa K, Ishii H. Enhanced plasma ghrelin levels in rats with streptozotocin-induced diabetes. *FEBS Lett*. 2003 Apr 24;541(1-3):64-8.

Mastrocola R, Reffo P, Penna F, Tomasinelli CE, Boccuzzi G, Baccino FM, Aragno M, Costelli P. Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2008 Feb 15;44(4):584-93. Epub 2007 Nov 1.

Matsunami T, Sato Y, Sato T, Ariga S, Shimomura T, Yukawa M. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009 Nov 30;3(2):177-88.

Matkovics B, Sasvári M, Kotormán M, Varga IS, Hai DQ, Varga C. Further prove on oxidative stress in alloxan diabetic rat tissues. *Acta Physiol Hung.* 1997-1998;85(3):183-92.

Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Aug;2(8):599-609.

McArdle A, Pattwell D, Vasilaki A, Griffiths RD, Jackson MJ. Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Mar;280(3):C621-7.

McGuire M, MacDermott M. The influence of streptozotocin diabetes and metformin on erythrocyte volume and on the membrane potential and the contractile characteristics of the extensor digitorum longus and soleus muscles in rats. *Exp Physiol.* 1999 Nov;84(6):1051-8.

McGuire M, MacDermott M. The influence of streptozotocin-induced diabetes and the antihyperglycaemic agent metformin on the contractile characteristics and the membrane potential of the rat diaphragm. *Exp Physiol.* 1998 Jul;83(4):481-7.

McKenna MJ, Medved I, Goodman CA, Brown MJ, Bjorksten AR, Murphy KT, Petersen AC, Sostaric S, Gong X. N-acetylcysteine attenuates the decline in muscle Na⁺,K⁺-pump activity and delays fatigue during prolonged exercise in humans. *J Physiol.* 2006 Oct 1;576(Pt 1):279-88. Epub 2006 Jul 13.

McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.* 1997 May 1;387(6628):83-90.

Medved I, Brown MJ, Bjorksten AR, Murphy KT, Petersen AC, Sostaric S, Gong X, McKenna MJ. N-acetylcysteine enhances muscle cysteine and glutathione availability and attenuates fatigue during prolonged exercise in endurance-trained individuals. *J Appl Physiol.* 2004 Oct;97(4):1477-85. Epub 2004 Jun 11.

Moopanar TR, Allen DG. Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca²⁺ sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37 degrees C. *J Physiol.* 2005 Apr 1;564(Pt 1):189-99. Epub 2005 Feb 17.

Moore RD, Munford JW, Pillsworth TJ Jr. Effects of streptozotocin diabetes and fasting on intracellular sodium and adenosine triphosphate in rat soleus muscle. *J Physiol.* 1983 May;338:277-94.

Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM, Winegar DA, Corton JC, Dohm GL, Kraus WE. Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *J Biol Chem.* 2002 Jul 19;277(29):26089-97. Epub 2002 May 6.

Murphy RM, Dutka TL, Lamb GD. Hydroxyl radical and glutathione interactions alter calcium sensitivity and maximum force of the contractile apparatus in rat skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 2008 Apr 15;586(8):2203-16. Epub 2008 Feb 28.

Nakagawa M, Kobayashi S, Kimura I, Kimura M. Diabetic state-induced modification of Ca, Mg, Fe and Zn content of skeletal, cardiac and smooth muscles. *Endocrinol Jpn.* 1989 Dec;36(6):795-807.

Novelli GP, Bracciotti G, Falsini S. Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice. *Free Radic Biol Med.* 1990;8(1):9-13.

Oktyabrsky ON, Smirnova GV. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc).* 2007 Feb;72(2):132-45.

Ortiz-Caro J, González C, Jolin T. Diurnal variations of plasma growth hormone, thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine in streptozotocin-diabetic and food-restricted rats. *Endocrinology.* 1984 Dec;115(6):2227-32.

Packer L, Cadenas E, Davies KJ. Free radicals and exercise: an introduction. *Free Radic Biol Med.* 2008 Jan 15;44(2):123-5. Epub 2007 Jun 6.

Palsamy P, Subramanian S. Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic beta-cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *J Cell Physiol.* 2010 Aug;224(2):423-32.

Pepato MT, Migliorini RH, Goldberg AL, Kettelhut IC. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol.* 1996 Aug;271(2 Pt 1):E340-7.

Pinheiro CH, Silveira LR, Nachbar RT, Vitzel KF, Curi R. Regulation of glycolysis and expression of glucose metabolism-related genes by reactive oxygen species in contracting skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2010 Apr 1;48(7):953-60. Epub 2010 Jan 18.

Pinheiro CH, Vitzel KF, Curi R. Effect of N-acetylcysteine on markers of skeletal muscle injury after fatiguing contractile activity. *Scand J Med Sci Sports.* 2012 Feb;22(1):24-33. Epub 2010 Jul 29.

Plant DR, Lynch GS, Williams DA. Hydrogen peroxide modulates Ca²⁺-activation of single permeabilized fibres from fast- and slow-twitch skeletal muscles of rats. *J Muscle Res Cell Motil.* 2000;21(8):747-52.

Posterino GS, Cellini MA, Lamb GD. Effects of oxidation and cytosolic redox conditions on excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 2003 Mar 15;547(Pt 3):807-23. Epub 2003 Jan 31.

Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008 Oct;88(4):1243-76.

Powers SK, Kavazis AN, McClung JM. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol.* 2007 Jun;102(6):2389-97. Epub 2007 Feb 8.

Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* 1999 Nov;58(4):1025-33.

Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:747-83. Epub 2002 Apr 2.

Price N, Proud C. The guanine nucleotide-exchange factor, eIF-2B. *Biochimie.* 1994;76(8):748-60.

Proud CG. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Feb;16(1):3-12. Epub 2004 Dec 10.

Py G, Eydoux N, Perez-Martin A, Raynaud E, Brun JF, Préfaut C, Mercier J. Streptozotocin-induced diabetes decreases rat sarcolemmal lactate transport. *Metabolism.* 2001 Apr;50(4):418-24.

Radák Z, Pucsok J, Mecseki S, Csont T, Ferdinandy P. Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 1999 Apr;26(7-8):1059-63.

Ramakrishna V, Jailkhani R. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetol.* 2008 Mar;45(1):41-6. Epub 2007 Oct 9.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1963; 1:785–789.

Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: The glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev.* 1998;14(4):263–83.

Rauramaa R, Harri M, Puhakainen E, Kuusela P, Hänninen O. Metabolic adaptation in muscle and brown adipose tissues to insulin deficiency in streptozotocin treated rats. *Comp Biochem Physiol B.* 1980;66(3):391-5.

Regensteiner JG, Sippel J, McFarling ET, Wolfel EE, Hiatt WR. Effects of non-insulin-dependent diabetes on oxygen consumption during treadmill exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 1995 May;27(5):661-7.

Reid MB, Khawli FA, Moody MR. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *J Appl Physiol.* 1993 Sep;75(3):1081-7.

Reid MB, Stokić DS, Koch SM, Khawli FA, Leis AA. N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. *J Clin Invest.* 1994 Dec;94(6):2468-74.

Reid MB. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc.* 2001 Mar;33(3):371-6.

Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Kang D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Mol Cells*. 2010 Jun;29(6):539-49. Epub 2010 Jun 4.

Rhees RW, Wilson CT, Heninger RW. Influence of streptozotocin diabetes and insulin therapy on plasma corticosterone levels in male rats. *Horm Metab Res*. 1983 Jul;15(7):353-4.

Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 26;106(21):8665-70. Epub 2009 May 11.

Roberts-Wilson TK, Reddy RN, Bailey JL, Zheng B, Ordas R, Gooch JL, Price SR. Calcineurin signaling and PGC-1 α expression are suppressed during muscle atrophy due to diabetes. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1803(8):960-7. Epub 2010 Mar 29.

Roy D, Marette A. Exercise induces the translocation of GLUT4 to transverse tubules from an intracellular pool in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jun 5;223(1):147-52.

Roy M, Collier B, Roy A. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation among diabetic outpatients. *Psychiatry Res*. 1990 Jan;31(1):31-7.

Rutschmann M, Dahlmann B, Reinauer H. Loss of fast-twitch isomyosins in skeletal muscles of the diabetic rat. *Biochem J*. 1984 Aug 1;221(3):645-50.

Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Seale P, Asakura A, Rudnicki MA. Reduced differentiation potential of primary MyoD $^{-/-}$ myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J Cell Biol*. 1999 Feb 22;144(4):631-43.

Salvi N, Guellich A, Michelet P, Demoule A, Le Guen M, Renou L, Bonne G, Riou B, Langeron O, Coirault C. Upregulation of PPAR β/δ is associated with structural and functional changes in the type I diabetes rat diaphragm. *PLoS One*. 2010 Jul 8;5(7):e11494.

Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*. 2008 Jun;23:160-70.

Sartori R, Milan G, Patron M, Mammucari C, Blaauw B, Abraham R, Sandri M. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 Jun;296(6):C1248-57. Epub 2009 Apr 8.

Scherer NM, Deamer DW. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca $^{2+}$ -ATPase. *Arch Biochem Biophys*. 1986 May 1;246(2):589-601.

Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr*. 2000 Aug;72(2 Suppl):653S-69S.

Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967;28(5):815–20.

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Jan;87(1):4-14. Epub 2009 Nov 6.

Silveira L, Hirabara SM, Alberici LC, Lambertucci RH, Peres CM, Takahashi HK, Pettri A, Alba-Loureiro T, Luchessi AD, Cury-Boaventura MF, Vercesi AE, Curi R. Effect of lipid infusion on metabolism and force of rat skeletal muscles during intense contractions. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(1-4):213-26.

Silveira LR, Fiamoncini J, Hirabara SM, Procópio J, Cambiaghi TD, Pinheiro CHJ, Lopes LR, Curi R. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. *J Cell Physiol*. 2008; 217(1):1-12.

Simonides WS, Thelen MH, van der Linden CG, Muller A, van Hardeveld C. Mechanism of thyroid-hormone regulated expression of the SERCA genes in skeletal muscle: implications for thermogenesis. *Biosci Rep*. 2001 Apr;21(2):139-54.

Skapek SX, Rhee J, Spicer DB, Lassar AB. Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science*. 1995 Feb 17;267(5200):1022-4.

Smith OL, Wong CY, Gelfand RA. Skeletal muscle proteolysis in rats with acute streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*. 1989;38:1117–22.

Soukup T, Zacharová G, Smerdu V. Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta Histochem*. 2002;104(4):399-405.

Stephenson GM, O'Callaghan A, Stephenson DG. Single-fiber study of contractile and biochemical properties of skeletal muscles in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 1994 May;43(5):622-8.

St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006 Oct 20;127(2):397-408.

Sun Z, Liu L, Liu N, Liu Y. Muscular response and adaptation to diabetes mellitus. *Front Biosci*. 2008 May 1;13:4765-94.

Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med*. 2008 Oct;74(13):1526-39. Epub 2008 Oct 20.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76(9):4350–4.

Toyoda T, Hayashi T, Miyamoto L, Yonemitsu S, Nakano M, Tanaka S, Ebihara K, Masuzaki H, Hosoda K, Inoue G, Otaka A, Sato K, Fushiki T, Nakao K. Possible involvement of the $\alpha 1$ isoform of 5'AMP-activated protein kinase in oxidative stress-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Jul;287(1):E166-73. Epub 2004 Mar 16.

Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 Jun;296(6):C1258-70. Epub 2009 Apr 8.

Tretter L, Adam-Vizi V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 Dec 29;360(1464):2335-45.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003 Oct 15;552(Pt 2):335-44.

Unsworth BR, Witzmann FA, Fitts RH. A comparison of rat myosin from fast and slow skeletal muscle and the effect of disuse. *J Biol Chem*. 1982 Dec 25;257(24):15129-36.

Ustanina S, Carvajal J, Rigby P, Braun T. The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification. *Stem Cells*. 2007 Aug;25(8):2006-16. Epub 2007 May 10.

van der Laan L, Oyen WJ, Verhofstad AA, Tan EC, ter Laak HJ, Gabreels-Festen A, Hendriks T, Goris RJ. Soft tissue repair capacity after oxygen-derived free radical-induced damage in one hindlimb of the rat. *J Surg Res*. 1997 Sep;72(1):60-9.

van Loon LJ, Goodpaster BH. Increased intramuscular lipid storage in the insulin resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch*. 2006; 451:606-16.

van Montfort RL, Congreve M, Tisi D, Carr R, Jhoti H. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature*. 2003 Jun 12;423(6941):773-7.

Vignaud A, Ramond F, Hourdé C, Keller A, Butler-Browne G, Ferry A. Diabetes provides an unfavorable environment for muscle mass and function after muscle injury in mice. *Pathobiology*. 2007;74(5):291-300.

Vitzel KF, Bikopoulos G, Hung S, Pistor KE, Patterson JD, Curi R, Ceddia RB. Chronic Treatment with the AMP-Kinase Activator AICAR Increases Glycogen Storage and Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscles but Does Not Reduce Hyperglucagonemia and Hyperglycemia in Insulin Deficient Rats. *PLoS One*. 2013 Apr 19;8(4):e62190.

Wang H, Hertlein E, Bakkar N, Sun H, Acharyya S, Wang J, Carathers M, Davuluri R, Guttridge DC. NF-kappaB regulation of YY1 inhibits skeletal myogenesis through transcriptional silencing of myofibrillar genes. *Mol Cell Biol*. 2007 Jun;27(12):4374-87. Epub 2007 Apr 16.

Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, Evans RM. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol*. 2004 Oct;2(10):e294. Epub 2004 Aug 24.

Westerblad H, Allen DG. Changes of myoplasmic calcium concentration during fatigue in single mouse muscle fibers. *J Gen Physiol*. 1991 Sep;98(3):615-35.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1047-53.

Winbanks CE, Weeks KL, Thomson RE, Sepulveda PV, Beyer C, Qian H, Chen JL, Allen JM, Lancaster GI, Febbraio MA, Harrison CA, McMullen JR, Chamberlain JS, Gregorevic P. Follistatin-mediated skeletal muscle hypertrophy is regulated by Smad3 and mTOR independently of myostatin. *J Cell Biol*. 2012 Jun 25;197(7):997-1008. Epub 2012 Jun 18.

Witczak CA, Sharoff CG, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Nov;65(23):3737-55.

Wojtaszewski JF, Hansen BF, Ursø B, Richter EA. Wortmannin inhibits both insulin- and contraction-stimulated glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1996 Oct;81(4):1501-9.

Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev*. 2013 Jan;93(1):23-67.

Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem*. 1997;253(2):162-8.

Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett*. 2005 Jun 6;579(14):3029-36.

Zissimopoulos S, Lai FA. Redox regulation of the ryanodine receptor/calcium release channel. *Biochem Soc Trans*. 2006 Nov;34(Pt 5):919-21.

APÊNDICE A – Parâmetros eletrofisiológicos do nervo ciático

Figura A1 – Parâmetros eletrofisiológicos do nervo ciático dos quatro grupos estudados.

O tratamento com NAC e o diabetes não alteraram a reobase e a cronaxia do nervo. Os resultados de no mínimo 6 observações estão apresentados como média $\pm$ EPM. NAC: N-acetil-L-cisteína.

APÊNDICE B – Tabela de resumo das alterações causadas pelo estado diabético e tratamento com NAC nos músculos sóleo e EDL de ratos

Tabela A1- Resumo das alterações causadas pelo estado diabético e tratamento com NAC nos músculos sóleo e EDL de ratos

(continua)

	NAC vs. Controle		Diabético vs. Controle		Diabético + NAC vs. Diabético	
	Sóleo	EDL	Sóleo	EDL	Sóleo	EDL
Liberação de H ₂ O ₂	↔	↔	↑	↑	↓	↓
GPX1	↑	↔	↓	↓	↑	↔
SOD1	↔	↔	↔	↔	↔	↔
SOD2	↑	↔	↓	↓	↑	↔
Catalase	↑	↔	↔	↑	↔	↓
Força isotônica absoluta	↔	↔	↓	↓	↔	↔
Força isotônica específica	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Força tetânica absoluta	↔	↑	↓	↓	↔	↔
Força tetânica específica	↔	↑	↔	↑	↔	↔
TTP	↔	↔	↔	↔	↔	↔
HRT	↔	↔	↔	↑	↔	↓
Tempo de sustentação da tetania	↔	↔	↓	↔	↑	↔
Resistência à fadiga	↑	↔	↓	↔	↑	↔
Glicogênio	↔	↔	↑	↑	↔	↔
HIF-1α	↔	↔	↓	↓	↑	↔
VEGF	↓	↔	↓	↓	↑	↔
SERCA1	↔	↔	↓	↑	↔	↓
SERCA2	↔	↔	↔	↑	↔	↓
PGC-1α	↓	↔	↓	↑	↑	↓
COX IV	↓	↔	↓	↑	↑	↓
NRF2	↔	↔	↔	↔	↔	↔
CPT1	↔	↔	↔	↑	↔	↔
PPARα	↑	↔	↓	↔	↑	↔
PPARβ	↔	↔	↔	↑	↔	↓
GLUT4	↑	↔	↓	↓	↑	↔
SDH	↑	↓	↔	↓	↑	↔
Citrato sintase	↑	↔	↓	↔	↑	↔

(conclusão)

	NAC vs. Controle		Diabético vs. Controle		Diabético + NAC vs. Diabético	
	Sóleo	EDL	Sóleo	EDL	Sóleo	EDL
MURF1	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Atrogina-1	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Fosfo-S6 / S6 total	↔	↓	↓	↓	↑	↔
Fosfo-eIF2α / eIF2α total	↔	↔	↔	↔	↔	↔
MyoD	↑	↔	↔	↔	↔	↔
Miogenina	↑	↔	↓	↔	↑	↔
Myf5	↔	↔	↔	↑	↔	↓
PCNA	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Miostatina	↓	↑	↔	↓	↔	↑
Folistatina	↓	↓	↓	↓	↔	↔
IGF-1	↔	↔	↓	↓	↔	↔
Bax / Bcl-2	↔	↓	↔	↓	↔	↔
Fosfo-AMPKα / AMPKα total	↔	↓	↑	↑	↓	↓
Desmina	↔	↔	↔	↓	↑	↔

↔ = sem alteração, ↑ = aumento, ↓ = redução

AMPKα: proteína quinase alfa ativada por AMP - *AMP-activated protein kinase alpha*; Bax: *Bcl-2-associated X protein*; Bcl-2: *B-cell leukemia / lymphoma 2*; COX IV: citocromo c oxidase subunidade IV; CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1; EDL: extensor digital longo; eIF2α: fator eucariótico de iniciação da tradução 2alfa - *eukaryotic translation initiation factor 2alpha*; GLUT4: transportador de glicose 4 - *glucose transporter 4*; GPX1: glutationa peroxidase 1; HIF-1α: fator induzido por hipóxia-1 alfa - *hypoxia-inducible factor-1 alpha*; HRT: *half relaxation time*; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1 - *insulin-like growth factor-1*; MURF1: *muscle RING-finger protein 1*; Myf5: fator miogênico 5 - *myogenic factor 5*; MyoD: fator de diferenciação miogênica - *myogenic differentiation factor*; NAC: N-acetil-L-cisteína; NRF2: fator respiratório nuclear 2 - *nuclear respiratory factor 2*; PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular - *proliferating cell nuclear antigen*; PGC-1α: co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos -1alfa - *peroxisome proliferator- activated receptor gamma co-activator 1alpha*; PPARα e β: receptores alfa e beta ativado por proliferadores de peroxissomos - *peroxisome proliferator-activated receptor alpha e beta*; SDH: succinato desidrogenase; SERCA1 e 2: ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático 1 e 2- *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 1 e 2*; SOD1 e 2: superóxido dismutase 1 e 2; TTP: *time to peak*; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular - *vascular endothelial growth factor*.

APÊNDICE C – *Ponceau* e *Western Blots* de α -tubulina e β -actina

Figura A2 – Membranas de nitrocelulose utilizadas para técnica de *western blotting* coradas com *ponceau*

Exemplos de *Ponceau* sóleo

Exemplos de *Ponceau* EDL

Membranas usadas para quantificação da carga total de proteína por poço. Esquerda: membranas com amostras do músculo sóleo. Direita: membranas com amostras do músculo EDL. EDL: extensor digital longo.

Figura A3 – Densidade óptica da quantificação de proteínas carregadas por poço em membranas para *western blotting* coradas com *Ponceau*.

Os resultados de no mínimo 6 observações estão apresentados como média $\pm$ EPM. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Figura A4 – Conteúdo de α -tubulina nos músculos sóleo e EDL nos diferentes grupos avaliados.

Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Figura A3 – Conteúdo de β -actina nos músculos sóleo e EDL nos diferentes grupos estudados.

Os resultados (média $\pm$ EPM) de no mínimo 4 observações foram comparados usando *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey-Kramer. EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

APÊNDICE D – Quadros de resultados

Quadro A1 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Peso (g) apresentados na Tabela 2.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
316	327	222	250
288	279	221	232
320	296	210	246
318	286	246	210
293	318	235	257
290	326	223	211
		213	230
		218	208
			251
304,2 $\pm$ 6,2	305,3 $\pm$ 8,6	223,5 $\pm$ 4,2	232,8 $\pm$ 6,5

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A2 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Glicemia (mg/dL) apresentados na Tabela 2.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
76	102	370	438
86	112	368	399
77	116	387	344
98	111	354	426
80	106	529	553
130		464	568
121		535	600
		507	544
		600	555
		600	600
		600	600
		600	600
		600	600
95,4 $\pm$ 8,3	109,4 $\pm$ 2,4	492,8 $\pm$ 29	525,2 $\pm$ 25

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A3 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Massa Sóleo/Tíbia (mg/cm) apresentados na Tabela 2.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
6,75	2,82	5,00	6,67
6,25	3,14	3,24	6,67
5,95	3,00	2,73	5,71
5,75	3,25	3,43	7,32
6,82	2,57	3,33	6,90
7,73	4,00	3,24	5,61
6,44	5,00	3,06	4,87
	3,14		6,10
	3,71		5,90
65,3 $\pm$ 0,25	61,9 $\pm$ 0,25	3,4 $\pm$ 0,25	3,43 $\pm$ 0,28

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A4 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Massa EDL/Tíbia (mg/cm) apresentados na Tabela 2.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
7,00	3,08	4,75	7,78
6,00	2,57	2,70	7,14
8,38	2,75	2,12	6,19
6,25	2,50	1,43	8,29
2,73	1,14	2,22	7,38
6,36	3,43	2,70	5,61
6,89	3,50	1,39	5,64
	2,29		6,59
	1,71		5,38
6,23 $\pm$ 0,65	6,67 $\pm$ 0,35	2,55 $\pm$ 0,26	2,47 $\pm$ 0,43

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A5 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Liberação de H₂O₂ (Relativo controle) do sóleo apresentados na Figura 2.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,18	0,74	1,60	0,45
0,69	0,35	1,24	1,15
0,89	0,55	2,03	0,59
1,25	0,88	1,48	0,44
1,10	0,86	1,22	0,99
1,09	0,40	2,15	
1,10			
0,71			
1 $\pm$ 0,07	0,63 $\pm$ 0,09	1,62 $\pm$ 0,16	0,72 $\pm$ 0,15

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A7 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Liberação de H₂O₂ após estimulação do sóleo (Relativo ao repouso) apresentados na Figura 3.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,64	0,71	0,59	1,49
1,74	0,92	0,94	1,21
1,87	1,26	0,54	1,29
1,90	0,53	1,09	1,45
1,47	0,57	1,13	0,67
	0,50	1,02	
	0,52	1,02	
1,72 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,11	0,90 $\pm$ 0,09	1,22 $\pm$ 0,15

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A9 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de GPX1 no sóleo apresentados na Figura 4.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,32	1,64	0,46	0,80
0,87	1,21	0,48	0,71
0,91	1,92	0,28	0,92
0,92	1,56	0,45	0,75
0,89	1,25	0,73	1,19
1,16			
1,01 $\pm$ 0,08	1,52 $\pm$ 0,13	0,48 $\pm$ 0,07	0,87 $\pm$ 0,09

GPX1: glutathione peroxidase 1; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A6 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Liberação de H₂O₂ (Relativo controle) do EDL apresentados na Figura 2.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,00	0,86	1,78	1,91
1,10	0,76	2,01	0,01
0,88	0,31	2,52	1,88
1,02	0,48	1,90	0,26
1,16	0,78	2,07	1,06
0,80		2,46	
0,94			
1,10			
1 $\pm$ 0,04	0,64 $\pm$ 0,10	2,12 $\pm$ 0,12	1,02 $\pm$ 0,40

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A8 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Liberação de H₂O₂ após estimulação do EDL (Relativo ao repouso) apresentados na Figura 3.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
2,01	0,48	0,64	1,32
1,14	0,99	1,11	0,55
1,22	0,78	1,37	0,78
2,75	0,69	1,33	0,81
1,68	0,81	1,29	1,54
	1,25	0,43	0,48
	0,63	1,35	0,66
	0,71	0,79	
		0,54	
		0,81	
1,76 $\pm$ 0,29	0,79 $\pm$ 0,08	0,97 $\pm$ 0,11	0,88 $\pm$ 0,15

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A10 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de GPX1 no EDL apresentados na Figura 4.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,06	1,22	0,60	0,38
1,06	0,98	0,50	0,56
1,27	1,37	0,79	0,34
0,84	1,28	0,73	0,88
0,76			0,57
1,09			
1,01 $\pm$ 0,08	1,21 $\pm$ 0,08	0,66 $\pm$ 0,07	0,54 $\pm$ 0,10

EDL: extensor digital longo; GPX1: glutathione peroxidase 1; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A11 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de SOD1 no sóleo apresentados na Figura 5.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,44	1,34	0,91	1,36
0,86	1,38	0,61	1,39
1,10	1,22	1,41	2,27
0,86	0,80	1,20	1,39
0,76	1,08	1,04	0,91
1,10	1,09	1,38	1,58
1,02 $\pm$ 0,10	1,15 $\pm$ 0,09	1,09 $\pm$ 0,12	1,48 $\pm$ 0,18

NAC: N-acetil-L-cisteína; SOD1: superóxido dismutase 1.

Quadro A13 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de SOD2 no sóleo apresentados na Figura 6.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,20	1,36	0,60	0,83
1,11	1,35	0,40	0,76
1,08	1,76	0,57	1,08
0,90	1,44	0,90	0,94
0,82	1,13	0,72	1,01
0,94			0,98
1,01 $\pm$ 0,06	1,41 $\pm$ 0,10	0,64 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,05

NAC: N-acetil-L-cisteína; SOD2: superóxido dismutase 2.

Quadro A15 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de catalase no sóleo apresentados na Figura 7.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,48	1,74	1,15	1,37
1,23	1,28	1,32	1,42
0,90	1,55	1,67	1,23
0,88	1,77	1,62	1,27
0,65	1,51		1,66
1,07			
1,04 $\pm$ 0,12	1,57 $\pm$ 0,09	1,44 $\pm$ 0,12	1,39 $\pm$ 0,08

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A12 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de SOD1 no EDL apresentados na Figura 5.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,29	0,86	0,76	1,33
1,38	1,24	0,74	1,32
0,71	0,84	1,29	1,15
0,71	1,05	1,42	1,15
1,11	2,31	1,94	0,80
	0,67	0,94	1,44
1,04 $\pm$ 0,14	1,16 $\pm$ 0,24	1,18 $\pm$ 0,19	1,20 $\pm$ 0,09

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; SOD1: superóxido dismutase 1.

Quadro A14 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de SOD2 no EDL apresentados na Figura 6.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,25	1,14	0,49	0,54
0,97	1,01	0,31	0,66
1,32	1,31	0,70	0,66
0,79	1,11	0,65	0,67
0,69	0,68	0,86	0,73
1,15			
1,03 $\pm$ 0,10	1,05 $\pm$ 0,10	0,60 $\pm$ 0,09	0,65 $\pm$ 0,03

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; SOD2: superóxido dismutase 2.

Quadro A16 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de catalase no EDL apresentados na Figura 7.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,20	2,03	2,33	1,98
0,68	1,30	2,63	1,71
1,35	1,11	3,10	2,12
0,94	1,06	2,59	1,01
0,79	0,84		2,32
1,23			
1,03 $\pm$ 0,11	1,27 $\pm$ 0,20	2,66 $\pm$ 0,16	1,83 $\pm$ 0,23

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A17 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Força isotônica absoluta (N) no sóleo apresentados na Figura 8.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,410	0,561	0,130	0,121
0,280	0,610	0,127	0,242
0,248	0,442	0,144	0,108
0,559	0,262	0,091	0,123
0,424	0,127	0,110	0,118
0,358	0,207	0,224	0,262
0,240	0,098	0,207	0,071
0,189	0,192	0,234	0,177
0,257	0,496	0,27	0,367
0,852	0,632	0,522	
0,527	0,358	0,106	
0,716	0,407	0,17	
0,146	0,966	0,159	
0,40 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,03

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A18 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Força isotônica absoluta (N) no EDL apresentados na Figura 8.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,337	0,354	0,144	0,23
0,254	0,56	0,117	0,073
0,264	0,337	0,138	0,453
0,300	0,441	0,114	0,099
0,187	0,301	0,132	0,121
0,367	0,179	0,215	0,194
0,948	0,513	0,196	
0,212	0,372	0,072	
0,803		0,202	
0,305		0,092	
		0,092	
		0,297	
		0,155	
0,40 $\pm$ 0,08	0,38 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,06

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A19 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Força isotônica específica (N/g) no sóleo apresentados na Figura 9.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
15,8	13,7	11,8	10,1
10,0	25,4	4,5	15,1
11,8	15,2	8,5	6,8
21,5	9,4	9,1	9,5
14,6	4,5	7,3	5,6
14,9	9,9	11,2	4,7
9,6	3,6	12,2	16,1
8,2	6,9	14,6	18,4
16,1	15,7	8,8	
4,6	17,6	9,9	
12,7 $\pm$ 1,5	12,2 $\pm$ 2,1	9,8 $\pm$ 0,9	10,8 $\pm$ 1,8

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A20 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Força isotônica específica (N/g) no EDL apresentados na Figura 9.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
13,0	12,2	16,0	20,9
9,4	9,9	11,7	7,3
8,5	12,6	15,3	11,0
10,7	9,4	14,3	10,1
6,9	11,2	9,4	12,9
14,7	5,6	11,3	
10,5	13,3	17,8	
		7,2	
		10,2	
		7,1	
		15,5	
10,5 $\pm$ 1,0	10,6 $\pm$ 1,0	12,3 $\pm$ 1,1	12,4 $\pm$ 2,3

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A21 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Força tetânica absoluta (N) no sóleo apresentados na Figura 10.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,88	2,04	0,39	0,50
1,94	1,99	0,43	0,95
1,16	1,83	0,49	0,47
2,79	1,10	0,50	0,89
1,36	0,51	0,53	0,47
1,67	0,64	0,66	0,69
0,69	0,38	0,63	0,27
0,95	0,91	0,43	0,80
0,66	1,83	1,17	1,38
2,86	1,62	1,38	
1,77	1,13	0,79	
2,61	1,04	1,09	
0,79		0,79	
1,63 $\pm$ 0,22	1,25 $\pm$ 0,17	0,71 $\pm$ 0,09	0,71 $\pm$ 0,11

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A22 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Força tetânica absoluta (N) no EDL apresentados na Figura 10.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,63	1,36	0,47	0,75
1,18	1,96	0,31	0,71
0,85	1,82	0,52	0,27
0,84	2,40	0,36	1,09
1,21	1,63	0,87	0,48
2,38	2,85	1,02	0,40
1,05	2,10	0,79	
1,84	1,94	0,50	
0,91	2,31	0,55	
	1,65	0,64	
		0,47	
		1,02	
		0,62	
1,21 $\pm$ 0,19	2,00 $\pm$ 0,14	0,63 $\pm$ 0,07	0,62 $\pm$ 0,12

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A23 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Força tetânica específica (N/g) no sóleo apresentados na Figura 11.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
72,2	49,8	35,6	41,6
69,4	82,8	15,4	59,3
55,0	63,2	28,9	29,4
47,0	39,4	50,2	68,5
69,8	18,2	35,3	22,3
27,6	30,3	33,0	17,9
41,1	14,2	36,8	72,9
41,3	32,6	26,9	68,9
24,8	40,0	65,8	
		49,3	
49,8 $\pm$ 6,0	41,2 $\pm$ 7,2	37,7 $\pm$ 4,5	47,6 $\pm$ 8,0

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A24 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Força tetânica específica (N/g) no EDL apresentados na Figura 11.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
21,0	46,9	51,7	67,9
45,2	78,2	30,7	98,4
31,4	53,6	57,6	70,7
27,1	68,5	45,4	27,2
43,1	50,8	61,9	53,2
20,0	52,1	53,7	33,6
31,3	58,9	71,5	87,1
		49,5	
		71,3	
		35,8	
		62,2	
31,3 $\pm$ 3,7	58,4 $\pm$ 4,2	53,8 $\pm$ 4,0	62,6 $\pm$ 10,0

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A25 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao TTP (ms) no sóleo apresentados na Figura 12.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
30	30	30	40
30	30	30	30
30	40	30	30
40	30	30	30
30	30	30	30
30	40	30	30
40	40	30	30
30	30	30	30
30	30	30	20
30	30	30	30
30	30	30	
30	30	30	
30	20	30	
40	30	40	
32,3 $\pm$ 1,2	31,5 $\pm$ 1,5	30,8 $\pm$ 0,8	30,0 $\pm$ 1,5

NAC: N-acetil-L-cisteína; TTP: *time to peak*.**Quadro A26** - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao TTP (ms) no EDL apresentados na Figura 12.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
30	30	40	30
50	30	30	40
30	40	30	40
30	30	30	30
40	40	30	20
30	30	30	40
40	30	30	30
30	30	30	30
40	20	30	
	30	30	
	20	30	
		20	
		30	
35,6 $\pm$ 2,4	30,0 $\pm$ 1,9	30,0 $\pm$ 1,1	32,5 $\pm$ 2,5

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; TTP: *time to peak*.**Quadro A27** - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao HRT (ms) no sóleo apresentados na Figura 13.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
20,6	17,5	23,1	13,5
19,8	21,4	23,2	21,0
21,9	18,3	19,6	18,6
28,0	23,1	23,1	25,1
22,7	20,1	23,7	21,2
23,5	45,6	31,1	13,2
18,0	25,6	17,7	26,5
17,1	22,6	15,8	18,9
18,3	16,3	19,7	23,0
16,6	24,9	19,0	22,9
15,7	26,5	32,6	
18,0	17,8	24,5	
31,2	13,0	25,4	
20,9 $\pm$ 1,3	22,5 $\pm$ 2,2	23,0 $\pm$ 1,4	20,4 $\pm$ 1,4

HRT: *half relaxation time*; NAC: N-acetil-L-cisteína.**Quadro A28** - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao HRT (ms) no EDL apresentados na Figura 13.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
18,6	34,2	34,3	19,0
29,7	22,5	33,2	25,3
19,1	20,1	37,1	28,0
27,7	22,8	37,2	19,0
30,4	24,7	32,5	19,0
30,0	21,2	25,1	18,6
22,2	27,9	34,8	24,9
20,1	19,2	21,7	26,0
13,3	14,5	24,0	
17,9	23,1	29,2	
18,8	20,6	23,1	
18,4	23,5	48,4	
	19,1	27,9	
		46,2	
22,2 $\pm$ 1,7	22,6 $\pm$ 1,3	32,5 $\pm$ 2,2	22,5 $\pm$ 1,4

EDL: extensor digital longo; HRT: *half relaxation time*; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A29 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Tempo de sustentação da tetania (s) no sóleo apresentados na Figura 14.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
6,73	4,02	1,06	2,54
6,90	5,22	0,93	3,23
3,20	3,94	0,36	3,64
5,65	4,04	1,77	2,78
3,31	4,03	0,47	6,08
2,90	3,98	1,89	2,87
1,17	3,43	0,12	4,76
5,07	3,82	0,07	3,34
4,83	3,43	5,00	
3,31	3,51	4,30	
3,42	5,56	4,43	
4,23 $\pm$ 0,53	4,09 $\pm$ 0,21	1,85 $\pm$ 0,56	3,66 $\pm$ 0,42

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A30 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Tempo de sustentação da tetania (s) no EDL apresentados na Figura 14.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
5,05	7,12	0,35	5,07
6,72	8,10	2,17	3,26
2,74	3,58	6,34	6,16
1,02	5,26	0,11	0,58
3,65	6,23	0,74	4,84
3,86	3,05	3,96	3,21
4,16	3,16	5,84	1,00
	4,69	7,27	2,65
	3,14	3,79	5,92
	6,39	5,79	
	3,77	5,85	
	4,54	0,08	
	5,39	6,26	
		6,76	
		4,67	
		4,67	
3,89 $\pm$ 0,67	4,96 $\pm$ 0,46	4,04 $\pm$ 0,64	3,63 $\pm$ 0,67

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A31 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Força (% em relação ao inicial) no sóleo apresentados na Figura 15.

Contrações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Controle	100	77	81	80	80	79	79	78	77	76
	100	95	93	89	85	80	77	74	69	65
	100	90	89	89	91	90	88	87	86	88
	100	85	90	85	85	82	84	80	78	77
	100	98	101	92	92	88	83	87	85	82
	100	86	79	75	76	75	74	74	75	72
	100	82	81	80	80	78	76	75	74	74
	100	87	86	86	83	83	81	80	79	80
	100	81	80	77	76	74	72	71	70	69
	100	96	94	91	91	87	84	82	84	80
	100 $\pm$ 0,0	87,7 $\pm$ 2,2	87,4 $\pm$ 2,3	84,4 $\pm$ 1,9	83,9 $\pm$ 1,9	81,6 $\pm$ 1,7	79,8 $\pm$ 1,6	78,8 $\pm$ 1,7	77,7 $\pm$ 1,9	76,3 $\pm$ 2,1
Contrações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NAC	100	93	82	84	82	81	79	82	75	76
	100	126	124	115	112	115	115	107	110	108
	100	99	101	104	91	94	86	88	89	85
	100	96	95	94	93	92	90	89	87	86
	100	100	101	97	98	100	95	94	95	94
	100	84	85	86	86	85	86	84	78	80
	100	89	88	85	82	80	79	77	75	74
	100	88	86	85	82	81	81	82	81	83
	100	90	86	83	80	78	77	75	75	73
	100	119	116	113	110	106	104	102	99	98
	100 $\pm$ 0,0	98,4 $\pm$ 4,3	96,4 $\pm$ 4,5	94,6 $\pm$ 3,9	91,6 $\pm$ 3,7	91,2 $\pm$ 4,0	89,2 $\pm$ 3,9	88,0 $\pm$ 3,3	86,4 $\pm$ 3,8	85,7 $\pm$ 3,6
Contrações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Diabético	100	77	72	69	75	72	72	72	71	67
	100	75	81	81	84	80	90	87	83	75
	100	74	75	72	73	72	72	71	73	80
	100	86	80	75	98	93	83	78	88	78
	100	43	41	42	43	43	42	43	43	42
	100	52	56	60	67	68	56	59	56	65
	100	89	84	85	82	80	80	77	76	75
	100	77	81	79	77	77	76	73	71	68
	100 $\pm$ 0,0	71,6 $\pm$ 5,7	71,3 $\pm$ 5,3	70,4 $\pm$ 4,9	74,9 $\pm$ 5,6	73,1 $\pm$ 5,1	73,4 $\pm$ 5,5	70,0 $\pm$ 4,8	70,1 $\pm$ 5,1	68,8 $\pm$ 4,3
Contrações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Diabético + NAC	100	103	110	104	100	97	96	90	90	87
	100	86	88	83	77	79	77	74	76	73
	100	109	85	87	87	91	94	106	100	97
	100	133	112	97	83	75	73	70	63	62
	100	70	70	70	68	69	68	65	65	64
	100	85	87	83	78	76	73	71	70	69
	100	115	132	125	128	124	120	115	112	112
	100	77	78	80	81	79	77	79	78	79
	100	84	82	82	82	78	76	72	70	67
	100 $\pm$ 0,0	95,8 $\pm$ 6,8	93,8 $\pm$ 6,6	90,1 $\pm$ 5,5	87,1 $\pm$ 5,9	85,3 $\pm$ 5,6	83,8 $\pm$ 5,5	82,4 $\pm$ 5,8	80,4 $\pm$ 5,6	78,9 $\pm$ 5,6

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A32 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Força (% em relação ao inicial) no EDL apresentados na Figura 15.

Contrações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Controle	100	73	70	74	75	76	79	79	81	82
	100	88	87	84	82	80	77	75	73	71
	100	83	82	80	75	71	67	65	64	60
	100	68	69	60	59	56	72	63	67	67
	100	90	89	89	90	89	89	87	88	88
	100	108	106	103	97	97	94	92	89	87
	100	100	94	90	86	83	81	79	75	71
	100	81	84	86	92	89	87	84	86	82
	100 $\pm$ 0,0	86,4 $\pm$ 4,7	85,1 $\pm$ 4,3	83,3 $\pm$ 4,5	82,0 $\pm$ 4,3	80,1 $\pm$ 4,5	80,8 $\pm$ 3,2	78,0 $\pm$ 3,6	77,9 $\pm$ 3,4	76,0 $\pm$ 3,6
Contrações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NAC	100	77	78	90	90	96	95	97	94	89
	100	83	83	81	77	78	76	73	75	66
	100	90	90	88	86	84	83	82	80	76
	100	92	91	89	87	85	84	81	77	74
	100	95	95	87	87	85	81	82	84	79
	100	96	99	100	98	92	95	90	91	88
	100	79	84	81	81	74	74	73	69	67
	100	85	84	80	77	73	70	67	64	61
	100	90	88	86	83	80	79	77	77	76
	100	75	76	76	73	72	70	67	66	65
	100	92	97	95	92	87	87	85	82	83
	100	101	96	95	93	88	87	81	78	78
	100	77	74	71	70	71	68	66	66	64
	100	72	70	70	70	71	71	71	71	71
	100 $\pm$ 0,0	86,0 $\pm$ 2,4	86,1 $\pm$ 2,5	84,9 $\pm$ 2,4	83,1 $\pm$ 2,4	81,1 $\pm$ 2,2	80,0 $\pm$ 2,4	78,0 $\pm$ 2,4	76,7 $\pm$ 2,4	74,1 $\pm$ 2,4
Contrações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Diabético	100	64	67	60	63	63	60	61	58	56
	100	87	91	91	114	100	92	101	95	84
	100	58	61	70	60	75	71	65	70	60
	100	93	91	84	86	83	81	78	83	74
	100	76	75	83	75	78	75	70	71	76
	100	114	104	97	95	90	92	88	85	84
	100	69	55	54	53	46	36	38	39	47
	100	86	93	96	95	94	92	92	90	88
	100	97	95	92	90	88	85	82	82	81
	100	73	90	93	97	96	93	88	85	80
	100	59	61	61	61	60	60	59	58	57
	100	95	100	99	100	96	94	89	83	75
	100 $\pm$ 0,0	80,5 $\pm$ 4,6	81,2 $\pm$ 4,6	80,9 $\pm$ 4,3	81,6 $\pm$ 5,2	80,0 $\pm$ 4,6	77,1 $\pm$ 4,8	75,6 $\pm$ 4,7	74,6 $\pm$ 4,3	71,9 $\pm$ 3,6
Contrações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Diabético + NAC	100	74	72	69	65	64	64	59	59	54
	100	96	88	88	83	82	82	82	80	80
	100	120	109	102	97	92	92	88	88	85
	100	105	106	104	107	99	101	94	88	88
	100	73	72	72	70	69	67	67	67	67
	100	86	86	83	82	78	73	73	71	70
	100	91	93	91	96	94	101	93	97	100
	100	96	82	89	80	79	77	76	72	78
	100	85	81	79	77	76	75	73	71	70
	100 $\pm$ 0,0	91,8 $\pm$ 4,9	87,7 $\pm$ 4,4	86,3 $\pm$ 4,0	84,1 $\pm$ 4,5	81,4 $\pm$ 3,9	81,3 $\pm$ 4,6	78,3 $\pm$ 4,0	77,0 $\pm$ 4,0	76,9 $\pm$ 4,5

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A33 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Índice de fadiga (área sob a curva força X contrações) no sóleo apresentados na Figura 16.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
718,7	1030,0	663,8	883,9
744,6	843,8	672,1	727,0
803,2	828,9	411,7	856,5
756,8	876,0	554,8	787,0
816,7	765,2	741,0	627,3
700,8	757,2	694,0	707,7
713,7	969,7		718,8
753,4			709,1
685,2			
798,8			
749,2 $\pm$ 14,4	867,3 $\pm$ 38,3	622,9 $\pm$ 49,1	752,2 $\pm$ 30,1

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A34 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Índice de fadiga (área sob a curva força X contrações) no EDL apresentados na Figura 16.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
698,1	811,4	573,9	603,3
732,3	709,4	862,2	771,4
667,3	772,6	611,9	879,8
598,3	772,3	765,0	897,4
805,5	784,8	690,9	641,2
880,4	855,2	857,5	717,1
773,3	698,4	464,4	856,7
780,9	679,4	831,3	739,0
	748,7	801,3	701,3
	657,1	804,8	
	807,6	558,9	
	807,7	842,8	
	646,8	666,4	
	652,8		
742,0 $\pm$ 31,0	743,2 $\pm$ 18,3	717,8 $\pm$ 36,7	756,3 $\pm$ 34,8

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A35 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Glicogênio (mg de unidades de glicosil) no sóleo apresentados na Figura 17.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,176	0,089	0,776	0,727
0,176	0,202	0,462	0,589
0,118	0,101	0,205	0,620
0,285	0,132	0,502	0,364
0,188		0,271	0,331
		0,529	0,295
0,189 $\pm$ 0,03	0,131 $\pm$ 0,03	0,458 $\pm$ 0,08	0,488 $\pm$ 0,07

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A36 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Glicogênio (mg de unidades de glicosil) no EDL apresentados na Figura 17.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,046	0,181	0,414	0,662
0,188	0,117	0,166	0,257
0,074	0,237	0,245	0,197
0,119	0,130	0,328	0,429
			0,242
			0,317
			0,244
0,107 $\pm$ 0,03	0,167 $\pm$ 0,03	0,289 $\pm$ 0,05	0,335 $\pm$ 0,06

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A37 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de VEGF (Relativo ao controle) no sóleo apresentados na Figura 18.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,76	0,435	0,681	0,765
1,501	0,671	0,679	0,676
0,739	0,449	0,625	0,558
1,522	0,386	0,454	1,061
0,734		0,479	0,937
0,744		0,504	1,162
1 $\pm$ 0,16	0,485 $\pm$ 0,06	0,570 $\pm$ 0,04	0,860 $\pm$ 0,09

NAC: N-acetil-L-cisteína; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular.

Quadro A38 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de VEGF (Relativo ao controle) no EDL apresentados na Figura 18.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,967	0,923	0,232	0,596
1,033	0,648	0,378	0,169
1,102	0,981	0,611	0,622
0,898	0,590	0,615	0,200
		0,390	0,236
			0,436
			0,847
			0,599
1 $\pm$ 0,04	0,790 $\pm$ 0,10	0,445 $\pm$ 0,07	0,463 $\pm$ 0,09

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular.

Quadro A39 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de HIF-1 α (Relativo ao controle) no sóleo apresentados na Figura 19.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,82	1,00	0,47	1,18
1,15	1,02	0,66	0,62
1,03	1,02	0,47	0,85
0,65		0,48	1,16
1,08			0,60
1,27			
1 $\pm$ 0,09	1,01 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,13

HIF-1 α : fator induzido por hipóxia-1 alfa; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A40 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de HIF-1 α (Relativo ao controle) no EDL apresentados na Figura 19.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,82	0,79	0,46	1,07
1,10	1,18	1,13	0,25
1,08	1,26	0,33	0,50
0,84	1,26	0,41	1,03
1,16			0,18
1 $\pm$ 0,07	1,12 $\pm$ 0,11	0,58 $\pm$ 0,18	0,61 $\pm$ 0,19

EDL: extensor digital longo; HIF-1 α : fator induzido por hipóxia-1 alfa; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A41 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de SERCA1 (Relativo ao controle) no sóleo apresentados na Figura 20.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,93	0,62	0,27	0,71
1,07	1,60	0,74	0,56
0,92	1,06	0,40	0,15
1,08	1,59	0,26	0,49
	0,60		0,33
1 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,22	0,42 $\pm$ 0,11	0,45 $\pm$ 0,10

NAC: N-acetil-L-cisteína; SERCA1: ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático 1.

Quadro A42 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de SERCA1 (Relativo ao controle) no EDL apresentados na Figura 20.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,78	1,14	3,16	1,36
1,30	1,30	2,80	1,09
0,92	0,65	2,31	1,24
1,17	0,32	0,85	0,79
0,83	0,55		1,66
	0,73		
1 $\pm$ 0,10	0,78 $\pm$ 0,15	2,28 $\pm$ 0,51	1,23 $\pm$ 0,14

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; SERCA1: ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático 1.

Quadro A43 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de SERCA2 (Relativo ao controle) no sóleo apresentados na Figura 21.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,95	0,98	0,45	0,76
1,05	0,65	0,87	0,82
0,73	1,09	1,24	1,60
1,07	1,23	0,65	0,28
1,20			0,98
			0,79
1 $\pm$ 0,08	0,99 $\pm$ 0,12	0,80 $\pm$ 0,17	0,87 $\pm$ 0,18

NAC: N-acetil-L-cisteína; SERCA2: ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático 2.

Quadro A45 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de PGC-1 α (Relativo ao controle) no sóleo apresentados na Figura 22.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,01	0,45	0,03	0,95
0,99	1,02	0,66	0,51
1,13	0,59	0,26	0,63
0,87		0,55	0,61
		0,08	0,55
1 $\pm$ 0,05	0,69 $\pm$ 0,17	0,32 $\pm$ 0,13	0,65 $\pm$ 0,08

NAC: N-acetil-L-cisteína; PGC-1 α : co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos -1alfa.

Quadro A47 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de COX IV (Relativo ao controle) no sóleo apresentados na Figura 23.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,90	0,81	0,18	0,77
1,10	0,44	0,58	0,90
0,76	1,17	0,04	0,54
1,24	0,37	0,88	0,66
	0,87		0,93
	0,61		
1 $\pm$ 0,11	0,71 $\pm$ 0,12	0,42 $\pm$ 0,19	0,76 $\pm$ 0,07

COX IV: citocromo c oxidase subunidade IV; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A44 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de SERCA2 (Relativo ao controle) no EDL apresentados na Figura 21.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,97	0,92	3,41	1,58
1,03	1,26	3,66	1,45
1,00	1,82	1,42	0,89
1,00	0,71	4,06	1,83
	0,46	1,60	0,53
	0,62		
1 $\pm$ 0,01	0,97 $\pm$ 0,21	2,83 $\pm$ 0,55	1,26 $\pm$ 0,24

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; SERCA2: ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático 2.

Quadro A46 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de PGC-1 α (Relativo ao controle) no EDL apresentados na Figura 22.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,58	0,98	1,73	1,37
1,39	1,35	1,85	0,85
1,04	1,10	2,09	1,02
1,16	0,67	1,53	0,62
1,08	0,99		
0,76	1,06		
1 $\pm$ 0,12	1,03 $\pm$ 0,09	1,80 $\pm$ 0,12	0,97 $\pm$ 0,16

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; PGC-1 α : co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos -1alfa.

Quadro A48 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de COX IV (Relativo ao controle) no EDL apresentados na Figura 23.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,58	0,70	1,57	1,25
0,87	0,89	1,82	1,34
1,56	0,79	1,37	1,05
0,54	0,96	1,45	1,23
1,21	1,27		
1,26	1,15		
1 $\pm$ 0,17	0,96 $\pm$ 0,09	1,55 $\pm$ 0,10	1,22 $\pm$ 0,06

COX IV: citocromo c oxidase subunidade IV; EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A49 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de NRF2 (Relativo ao controle) no sóleo apresentados na Figura 24.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,11	1,31	0,73	1,71
0,89	1,20	1,51	1,15
1,13	1,07	1,55	1,37
0,99	1,03	1,94	1,02
0,88	1,17	1,21	1,27
		0,86	
		0,89	
1 $\pm$ 0,05	1,16 $\pm$ 0,05	1,24 $\pm$ 0,17	1,30 $\pm$ 0,12

NAC: N-acetil-L-cisteína; NRF2: fator respiratório nuclear 2.

Quadro A51 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de CPT1 (Relativo ao controle) no sóleo apresentados na Figura 25.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,81	1,59	0,96	2,27
1,31	1,43	1,26	0,49
0,88	0,97	0,86	0,55
1,34	0,92	1,00	0,91
0,82	0,96	0,97	0,98
0,84	1,26	1,10	0,92
		1,09	1,11
1 $\pm$ 0,10	1,19 $\pm$ 0,12	1,03 $\pm$ 0,05	1,03 $\pm$ 0,22

CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A53 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de PPAR α no sóleo apresentados na Figura 26.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,30	2,24	0,59	0,98
1,14	1,45	0,53	0,84
0,76	1,82	0,56	1,10
0,79	1,82	0,56	1,05
0,92			1,05
1,23			
1,02 $\pm$ 0,09	1,83 $\pm$ 0,16	0,56 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,05

NAC: N-acetil-L-cisteína; PPAR α : receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomos.

Quadro A50 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de NRF2 (Relativo ao controle) no EDL apresentados na Figura 24.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,30	1,44	1,33	1,29
1,06	1,08	1,32	0,83
0,64	1,04	0,65	0,62
1,01	0,88	0,30	0,44
0,99	1,11	1,37	1,45
	1,31	1,20	1,77
1 $\pm$ 0,11	1,14 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,18	1,07 $\pm$ 0,21

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; NRF2: fator respiratório nuclear 2.

Quadro A52 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de CPT1 (Relativo ao controle) no EDL apresentados na Figura 25.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,83	1,21	1,55	1,37
1,05	1,19	1,37	1,33
1,12	1,27	1,36	1,22
0,62	1,19	1,14	1,14
1,17	0,98	1,27	1,57
1,21		1,23	
1 $\pm$ 0,09	1,17 $\pm$ 0,05	1,32 $\pm$ 0,06	1,33 $\pm$ 0,07

CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1; EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A54 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de PPAR α no EDL apresentados na Figura 26.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,05	1,27	1,40	0,64
0,64	1,36	0,66	0,66
1,67	0,88	1,04	1,18
1,56	0,70	0,97	1,23
0,56	2,02	1,07	0,71
	0,59	0,92	1,13
1,10 $\pm$ 0,23	1,14 $\pm$ 0,22	1,01 $\pm$ 0,10	0,93 $\pm$ 0,12

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; PPAR α : receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomos.

Quadro A55 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de PPAR β no sóleo apresentados na Figura 27.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,77	1,05	0,70	1,13
1,18	1,00	1,18	0,69
0,85	1,12	0,45	1,21
0,72	1,31	1,02	0,79
0,74	1,43	0,90	0,80
1,06	1,58	0,75	0,94
1,05 $\pm$ 0,16	1,25 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,11	0,93 $\pm$ 0,08

NAC: N-acetil-L-cisteína; PPAR β : receptor beta ativado por proliferadores de peroxissomos.

Quadro A57 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de GLUT4 no sóleo apresentados na Figura 28.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,04	1,79	0,70	0,80
0,91	1,52	0,37	1,17
0,96	1,52	0,55	1,36
0,90	1,77	0,70	0,85
1,16	1,45	0,79	0,75
1,04			1,56
1,00 $\pm$ 0,04	1,61 $\pm$ 0,07	0,62 $\pm$ 0,07	1,08 $\pm$ 0,14

GLUT4: transportador de glicose 4; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A59 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de citrato sintase no sóleo apresentados na Figura 29.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,18	1,47	0,44	0,74
1,25	1,50	0,76	0,90
0,74	1,31	0,42	1,27
0,88	1,66	0,64	0,86
0,92		0,79	0,82
1,14			
1,02 $\pm$ 0,08	1,49 $\pm$ 0,07	0,61 $\pm$ 0,08	0,92 $\pm$ 0,09

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A61 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de SDH no sóleo apresentados na Figura 30.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,02	1,46	1,04	1,22
0,91	1,23	0,58	1,68
1,02	1,60	1,22	1,26
0,88	1,35	1,23	1,42
1,18		0,80	
1,02		1,25	
1,00 $\pm$ 0,04	1,41 $\pm$ 0,08	1,02 $\pm$ 0,11	1,40 $\pm$ 0,10

NAC: N-acetil-L-cisteína; SDH: succinato desidrogenase.

Quadro A56 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de PPAR β no EDL apresentados na Figura 27.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,75	1,40	2,66	1,17
0,61	1,07	2,68	1,38
1,33	1,11	2,43	2,22
1,44	0,95	2,24	1,82
0,62	2,19	2,38	1,45
0,80	0,97		1,98
1,09 $\pm$ 0,20	1,28 $\pm$ 0,19	2,48 $\pm$ 0,08	1,67 $\pm$ 0,16

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; PPAR β : receptor beta ativado por proliferadores de peroxissomos.

Quadro A58 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de GLUT4 no EDL apresentados na Figura 28.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,17	0,79	0,50	0,46
1,43	0,85	0,28	0,68
0,84	1,08	0,50	0,66
0,76	0,93	0,54	0,63
0,94	0,72	1,02	0,47
		0,65	0,71
1,03 $\pm$ 0,12	0,87 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,10	0,60 $\pm$ 0,05

EDL: extensor digital longo; GLUT4: transportador de glicose 4; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A60 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de citrato sintase no EDL apresentados na Figura 29.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,02	1,30	0,99	0,99
0,56	1,06	0,72	0,90
1,40	1,20	0,88	0,81
1,71	0,90	0,65	0,67
1,90	0,83	0,92	0,92
0,38		0,92	
1,16 $\pm$ 0,25	1,06 $\pm$ 0,09	0,85 $\pm$ 0,05	0,86 $\pm$ 0,06

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A62 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de SDH no EDL apresentados na Figura 30.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,76	0,75	0,55	0,59
1,13	0,79	0,25	0,81
0,93	0,78	0,50	0,59
1,52	0,63	0,55	0,75
	0,51	0,72	0,59
		0,56	0,72
1,09 $\pm$ 0,16	0,69 $\pm$ 0,05	0,52 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,04

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; SDH: succinato desidrogenase.

Quadro A63 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de atrogina-1 (Relativo o controle) no sóleo apresentados na Figura 31.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,89	1,30	1,19	1,27
1,06	1,06	1,19	1,11
1,05	1,16	0,93	0,86
0,93	1,08	0,82	0,87
1,08	1,09	1,28	1,07
1,00	0,66	1,22	0,97
		1,21	1,66
1 $\pm$ 0,03	1,06 $\pm$ 0,09	1,12 $\pm$ 0,07	1,12 $\pm$ 0,11

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A64 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de atrogina-1 (Relativo o controle) no EDL apresentados na Figura 31.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,64	0,82	1,18	1,37
1,31	1,37	1,87	1,40
1,06	1,04	1,03	0,69
0,80	1,14	0,89	0,21
1,08	1,00	1,11	1,04
1,12		1,15	1,17
		0,68	0,53
1 $\pm$ 0,10	1,07 $\pm$ 0,09	1,13 $\pm$ 0,14	0,92 $\pm$ 0,17

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A65 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de MURF1 (Relativo o controle) no sóleo apresentados na Figura 32.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,43	1,12	0,61	1,13
1,38	1,38	1,36	0,72
1,18	1,06	0,80	0,49
0,73	1,02	0,95	0,95
1,64	0,60	1,30	1,89
0,62	0,72	0,59	0,77
		0,54	0,70
1 $\pm$ 0,19	0,98 $\pm$ 0,12	0,88 $\pm$ 0,13	0,95 $\pm$ 0,17

MURF1: *muscle RING-finger protein 1*; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A66 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de MURF1 (Relativo o controle) no EDL apresentados na Figura 32.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,80	0,51	0,99	1,22
0,79	1,16	1,23	1,41
1,41	1,31	1,27	0,89
1,36	0,72	0,64	0,99
0,74	0,75	1,05	0,95
0,90	0,78	1,06	1,13
		0,88	
1 $\pm$ 0,12	0,87 $\pm$ 0,12	1,02 $\pm$ 0,08	1,10 $\pm$ 0,08

EDL: extensor digital longo; MURF1: *muscle RING-finger protein 1*; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A67 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Razão p-S6 / S6 total (Relativo o controle) no sóleo apresentados na Figura 33.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,16	0,67	0,56	1,29
0,84	0,88	0,07	0,62
1,30	0,61	0,03	0,46
0,66	0,99	0,12	0,19
1,03			1,07
			0,98
1 $\pm$ 0,11	0,79 $\pm$ 0,09	0,20 $\pm$ 0,12	0,77 $\pm$ 0,17

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A68 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Razão p-S6 / S6 total (Relativo o controle) no EDL apresentados na Figura 33.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,97	0,64	0,79	0,14
1,03	0,12	0,44	0,75
1,32	0,21	0,36	0,31
1,02	0,68	0,25	0,51
0,66	0,84		
	0,23		
1 $\pm$ 0,11	0,45 $\pm$ 0,12	0,46 $\pm$ 0,12	0,43 $\pm$ 0,13

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A69 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Razão p-eIF2 α / eIF2 α total (Relativo o controle) no sóleo apresentados na Figura 34.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,98	0,60	0,63	0,90
1,02	1,12	1,10	0,91
1,04	0,68	0,63	0,71
0,99	0,78	1,13	0,94
0,97		0,83	1,27
		0,73	1,40
		0,89	
1 $\pm$ 0,01	0,80 $\pm$ 0,11	0,85 $\pm$ 0,08	1,02 $\pm$ 0,11

eIF2 α : fator eucariótico de iniciação da tradução 2alfa; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A71 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de MyoD no sóleo apresentados na Figura 35.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,38	2,33	0,73	0,86
1,82	1,87	0,77	0,78
0,51	1,55	1,77	0,85
0,71	1,79	1,43	0,74
0,87	2,29	0,71	
1,25	2,08		
1,09 $\pm$ 0,20	1,99 $\pm$ 0,12	1,08 $\pm$ 0,22	0,81 $\pm$ 0,03

MyoD: fator de diferenciação miogênica; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A73 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de Myf5 no sóleo apresentados na Figura 36.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,17	1,32	0,80	1,11
1,14	1,35	1,16	1,23
0,94	1,27	1,62	1,65
0,75	1,00	1,49	1,07
0,72	1,32	0,93	0,76
1,48	1,31	1,25	1,84
1,03 $\pm$ 0,12	1,26 $\pm$ 0,05	1,21 $\pm$ 0,13	1,28 $\pm$ 0,16

Myf5: fator miogênico 5; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A75 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de miogenina no sóleo apresentados na Figura 37.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,19	1,42	0,18	0,51
1,18	1,06	0,29	0,96
0,68	2,08	0,15	0,42
1,09	1,19	0,25	1,03
0,76	1,43	0,28	1,04
1,27	2,14	0,28	
1,03 $\pm$ 0,10	1,55 $\pm$ 0,18	0,24 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,14

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A70 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Razão p-eIF2 α / eIF2 α total (Relativo o controle) no EDL apresentados na Figura 34.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,11	1,32	0,84	1,00
1,01	0,96	0,99	0,77
0,88	1,25	0,60	1,05
0,84	1,29	1,11	1,11
1,04	0,76	1,55	1,10
1,11	1,11	0,67	1,60
			1,04
1 $\pm$ 0,05	1,12 $\pm$ 0,09	0,96 $\pm$ 0,14	1,10 $\pm$ 0,09

EDL: extensor digital longo; eIF2 α : fator eucariótico de iniciação da tradução 2alfa; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A72 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de MyoD no EDL apresentados na Figura 35.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,70	0,80	1,16	0,57
0,69	0,73	1,79	0,82
1,08	1,60	0,82	0,91
2,11	0,77	1,38	1,40
0,94	2,47	1,80	0,94
0,40	0,78	1,22	1,05
1,15 $\pm$ 0,26	1,19 $\pm$ 0,29	1,36 $\pm$ 0,16	0,95 $\pm$ 0,11

EDL: extensor digital longo; MyoD: fator de diferenciação miogênica; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A74 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de Myf5 no EDL apresentados na Figura 36.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,35	1,47	1,62	1,38
1,08	1,54	1,88	1,52
1,66	1,25	1,48	1,57
0,82	1,30	2,65	1,57
0,81	0,73	2,38	1,27
0,62			1,43
1,06 $\pm$ 0,16	1,26 $\pm$ 0,14	2,00 $\pm$ 0,22	1,46 $\pm$ 0,05

EDL: extensor digital longo; Myf5: fator miogênico 5; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A76 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de miogenina no EDL apresentados na Figura 37.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,12	0,95	1,04	0,34
1,59	0,87	1,34	0,54
1,13	0,84	0,92	1,01
1,35	0,69	0,97	1,18
0,62	0,61	0,77	0,60
0,60		0,61	1,04
1,07 $\pm$ 0,16	0,79 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,10	0,79 $\pm$ 0,14

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A77 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de PCNA no sóleo apresentados na Figura 38.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,23	1,75	1,61	1,22
1,21	1,52	0,91	1,00
1,06	1,21	1,39	1,74
0,85	0,78	1,49	1,49
1,01	1,32	0,71	0,97
0,73	1,09	1,34	1,52
1,02 $\pm$ 0,08	1,28 $\pm$ 0,14	1,24 $\pm$ 0,14	1,32 $\pm$ 0,13

NAC: N-acetil-L-cisteína; PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular.

Quadro A79 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de IGF-1 no sóleo apresentados na Figura 39.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,29	0,90	0,51	0,47
1,15	0,84	0,35	0,45
0,80	0,94	0,89	0,70
0,94	1,39	0,63	0,51
0,90	1,19	0,68	0,90
1,00	0,85	0,47	0,96
1,01 $\pm$ 0,07	1,02 $\pm$ 0,09	0,59 $\pm$ 0,08	0,67 $\pm$ 0,09

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A81 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de miostatina no sóleo apresentados na Figura 40.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,42	0,24	0,79	0,64
0,72	0,11	1,11	1,59
0,67	0,32	1,18	0,48
1,46	0,34	0,27	0,88
	0,17	1,70	
1,07 $\pm$ 0,22	0,24 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,24	0,90 $\pm$ 0,25

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A83 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de folistatina no sóleo apresentados na Figura 41.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,35	0,54	0,71	0,39
0,88	0,47	0,43	0,44
1,34	0,89	0,76	0,69
1,02	0,73	0,38	0,61
0,70	0,61	0,92	
0,88			
1,03 $\pm$ 0,11	0,65 $\pm$ 0,07	0,64 $\pm$ 0,10	0,53 $\pm$ 0,07

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A78 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de PCNA no EDL apresentados na Figura 38.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,36	1,40	0,83	1,04
1,73	1,05	0,96	1,56
1,26	0,99	1,41	1,63
0,81	0,73	1,18	1,27
1,03	1,34	1,97	0,99
0,41	0,55	1,47	0,98
1,10 $\pm$ 0,19	1,01 $\pm$ 0,14	1,30 $\pm$ 0,17	1,25 $\pm$ 0,12

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína; PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular.

Quadro A80 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de IGF-1 no EDL apresentados na Figura 39.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,77	0,76	0,34	0,49
1,28	0,64	0,31	0,50
1,02	0,89	0,50	0,52
0,87	0,94	0,46	0,60
1,14	1,39	0,90	0,66
		0,60	0,76
1,02 $\pm$ 0,09	0,92 $\pm$ 0,13	0,52 $\pm$ 0,09	0,59 $\pm$ 0,04

EDL: extensor digital longo; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A82 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de miostatina no EDL apresentados na Figura 40.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,88	1,15	0,79	1,25
0,74	1,75	0,32	0,94
1,58	1,87	0,89	0,84
1,22	2,58	0,61	1,82
0,68	1,42		
1,18			
1,05 $\pm$ 0,14	1,75 $\pm$ 0,24	0,65 $\pm$ 0,13	1,21 $\pm$ 0,22

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A84 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de folistatina no EDL apresentados na Figura 41.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,70	0,88	0,36	0,45
1,28	0,40	0,35	0,70
1,23	0,48	0,67	0,52
	0,72	0,50	0,57
	0,48	0,93	0,60
			0,82
1,07 $\pm$ 0,19	0,59 $\pm$ 0,09	0,56 $\pm$ 0,11	0,61 $\pm$ 0,05

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A85 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Razão de mRNA Bax/Bcl-2 no sóleo apresentados na Figura 42.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,82	0,84	0,99	0,70
1,04	1,12	0,47	1,19
1,03	1,09	0,91	0,89
1,08	0,69	0,87	1,03
0,97	0,67	0,75	0,80
1,08	0,92	0,98	0,95
1,00 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,08	0,83 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,07

Bax: *Bcl-2 associated X protein*; Bcl-2: *B-cell leukemia-2*; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A87 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Razão p-AMPK α / AMPK α total (Relativo ao controle) no sóleo apresentados na Figura 43.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,60	0,62	2,35	0,78
0,43	0,83	1,84	1,73
0,97	0,31	1,36	1,58
1,20	1,98	2,33	0,81
0,65	1,55	1,85	1,24
1,15	0,65	3,09	0,72
1 $\pm$ 0,17	0,99 $\pm$ 0,26	2,14 $\pm$ 0,24	1,14 $\pm$ 0,18

AMPK α : proteína quinase alfa ativada por AMP; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A89 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de desmina (Relativo ao controle) no sóleo apresentados na Figura 44.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,82	1,24	0,85	1,31
0,99	1,30	0,69	1,42
1,19	1,46	0,82	1,23
1,08	0,95	0,91	1,08
0,92	0,62	0,66	1,29
	1,48		
1 $\pm$ 0,06	1,18 $\pm$ 0,14	0,79 $\pm$ 0,05	1,27 $\pm$ 0,06

NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A86 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Razão de mRNA Bax/Bcl-2 no EDL apresentados na Figura 42.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,90	0,57	0,58	0,48
1,80	0,93	0,55	0,87
0,89	0,53	0,69	0,79
0,72	0,73	0,70	0,58
0,80	0,65	0,52	0,80
1,19	0,60	0,44	0,50
1,05 $\pm$ 0,16	0,67 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,04	0,67 $\pm$ 0,07

Bax: *Bcl-2 associated X protein*; Bcl-2: *B-cell leukemia-2*; EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A88 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Razão p-AMPK α / AMPK α total (Relativo ao controle) no EDL apresentados na Figura 43.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
0,71	0,53	1,24	1,49
0,88	0,75	2,96	0,54
1,41	0,60	1,27	1,36
1,25	0,59	2,85	1,24
0,67	0,78	3,10	2,12
1,07	0,52		0,76
1 $\pm$ 0,12	0,63 $\pm$ 0,05	2,28 $\pm$ 0,42	1,25 $\pm$ 0,23

AMPK α : proteína quinase alfa ativada por AMP; EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

Quadro A90 - Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao Conteúdo de desmina (Relativo ao controle) no EDL apresentados na Figura 44.

Controle	NAC	Diabético	Diabético + NAC
1,56	1,05	0,79	0,55
0,96	0,62	0,57	0,47
0,48	1,00	0,31	0,39
0,99	0,94	0,34	0,31
1,01	1,34		
1 $\pm$ 0,17	0,99 $\pm$ 0,12	0,50 $\pm$ 0,11	0,43 $\pm$ 0,05

EDL: extensor digital longo; NAC: N-acetil-L-cisteína.

APÊNDICE E – Artigos publicados em periódicos

Vitzel KF, Bikopoulos G, Hung S, Pistor KE, Patterson JD, Curi R, Ceddia RB. Chronic treatment with the AMP-kinase activator AICAR increases glycogen storage and fatty acid oxidation in skeletal muscles but does not reduce hyperglucagonemia and hyperglycemia in insulin deficient rats. *PLoS One*. 2013 Apr 19;8(4):e62190. Print 2013.

Guimarães-Ferreira L, Pinheiro CH, Gerlinger-Romero F, **Vitzel KF**, Nachbar RT, Curi R, Nunes MT. Short-term creatine supplementation decreases reactive oxygen species content with no changes in expression and activity of antioxidant enzymes in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2012 Nov;112(11):3905-11. Epub 2012 Mar 14.

Pinheiro CH, Gerlinger-Romero F, Guimarães-Ferreira L, de Souza-Jr AL, **Vitzel KF**, Nachbar RT, Nunes MT, Curi R. Metabolic and functional effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2012 Jul;112(7):2531-7. Epub 2011 Nov 11.

Silveira LR, Pinheiro CH, Zoppi CC, Hirabara SM, **Vitzel KF**, Bassit RA, Barbosa MR, Sampaio IH, Melo IH, Fiamoncini J, Carneiro EM, Curi R. Regulation of glucose and fatty acid metabolism in skeletal muscle during contraction. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011 Jun;55(5):303-13.

Rodrigues HG, Vinolo MA, Magdalon J, **Vitzel K**, Nachbar RT, Pessoa AF, dos Santos MF, Hatanaka E, Calder PC, Curi R. Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. *J Invest Dermatol*. 2012 Jan;132(1):208-15. Epub 2011 Sep 1.

Pinheiro CH, de Queiroz JC, Guimarães-Ferreira L, **Vitzel KF**, Nachbar RT, de Sousa LG, de Souza-Jr AL, Nunes MT, Curi R. Local injections of adipose-derived mesenchymal stem cells modulate inflammation and increase angiogenesis ameliorating the dystrophic phenotype in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Stem Cell Rev*. 2012 Jun;8(2):363-74.

Newsholme P, Abdulkader F, Rebelato E, Romanatto T, Pinheiro CH, **Vitzel KF**, Silva EP, Bazotte RB, Procopio J, Curi R, Gorjao R, Pithon-Curi TC. Amino acids and diabetes: implications for endocrine, metabolic and immune function. *Front Biosci*. 2011 Jan 1;16:315-39.

Pinheiro CH, **Vitzel KF**, Curi R. Effect of N-acetylcysteine on markers of skeletal muscle injury after fatiguing contractile activity. *Scand J Med Sci Sports*. 2012 Feb;22(1):24-33. Epub 2010 Jul 29.

Pinheiro CH, Silveira LR, Nachbar RT, **Vitzel KF**, Curi R. Regulation of glycolysis and expression of glucose metabolism-related genes by reactive oxygen species in contracting skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2010 Apr 1;48(7):953-60. Epub 2010 Jan 18.

Bassit RA, Pinheiro CH, **Vitzel KF**, Sproesser AJ, Silveira LR, Curi R. Effect of short-term creatine supplementation on markers of skeletal muscle damage after strenuous contractile activity. *Eur J Appl Physiol*. 2010 Mar;108(5):945-55. Epub 2009 Dec 3.