CARLA WERLANG COELHO

**Efeitos do treinamento físico sobre a miopatia esquelética
em modelo experimental de sepse**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Anestesiologia
Orientador: Prof. Dr. Eliézer Silva

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Coelho, Carla Werlang

Efeitos do treinamento físico sobre a miopatia esquelética em modelo experimental de sepse / Carla Werlang Coelho. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Anestesiologia.

Orientador: Eliézer Silva.

Descritores: 1.Sepse 2.Estresse oxidativo 3.Miopatias 4.Exercício físico
5.Músculo esquelético 6.Metabolismo energético

USP/FM/DBD-354/12

DEDICATÓRIA

Ao amado Luiz Antônio Ferreira Coelho,
meu incansável incentivador, presente em
todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha família, esposo Luiz Antônio Ferreira Coelho, aos meus queridos Fábio Werlang, Alvanir Michelin e Maria do Carmo Coelho, pelo apoio incondicional, e aos meus pais Margarida Sthal Werlang e Rudi Werlang (*in memoriam*), meu eterno agradecimento.

Ao orientador Prof. Dr. Eliézer Silva pela confiança, apoio e orientação. Pela constante atenção e permanente presteza na resolução das dificuldades encontradas no decorrer do estudo.

Ao amigo e colaborador Dr. Glauco Adrieno Westphal pela contribuição nas constantes discussões e parcerias nos projetos de pesquisa.

Aos membros da banca de defesa da tese, pela participação desse processo tão importante na vida acadêmica: obrigada por aceitarem o convite.

À Claudia Pereira, Alexsandra Moraes e Arlen Cirino, pela simpatia e dedicação aos trabalhos de secretaria do programa de pós-graduação. Aos coordenadores do curso, Prof. Dr. José Otávio Costa Auler Junior e Profa. Dra. Maria José Carvalho Carmona pela competência dedicada ao programa de pós-graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina da USP.

À Profa. Dra. Patrícia Chakur Brum, da Escola de Educação Física e Esporte da USP, pela competência e oportunidade de realizar várias análises no Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício. Também gostaria de agradecer aos técnicos do laboratório Marcele Coelho, Alex Monteiro, Ney de Almeida, Glória da Mota e Katt Mattos. Aos amigos e colegas Aline

Bacurau, Vanessa Voltarelli, Luiz Bechara, Juliane Campos, Luiz Bozi, Telma Cunha, Katia Gomes, Christiano Alves, Nathalie Paixão, Andrea Vanzelli, Alessandra Medeiros, Daniele Costa, Úrsula Soci e Tiago Fernandes pela constante troca de informações e discussão científica.

Aos meus incansáveis amigos e colaboradores científicos Paulo Jannig e Arlete de Souza.

Ao Dr. Hercílio Fronza Jr, diretor técnico dos Serviços Integrados de Patologia (SIP), pelo constante apoio científico e de estrutura do laboratório para realização das análises histológicas. Ao Rodrigo Blasius e Marisa Eisenhut pela competência e amizade.

Aos Professores Dr. Paulo França e Dr. Mauro Pinho, a MSc.Leslie Ferreira pelo apoio na utilização do Labiomol. A Charlise Aguilera e a Elizabeth Lucio pela constante colaboração.

As instituições Universidade do Estado de Santa Catarina/Udesc/Joinville e a Universidade da Região de Joinville/Unville.

Ao Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol e ao Prof. Dr. Emílio Streck pela possibilidade de fazer parte das análises no Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Unesc. As amigas e colegas Fabrícia Petronilho, Larissa Constantino, Gabriela Ferreira pela constante ajuda e discussões inerentes a pesquisa. Aos amigos Glauco Duarte Luz e João Paulo de Costa pela amizade e apoio.

À Profa. Dra. Cláudia Ortolani-Machado e à Profa. Dra. Lucélia Donatti, aos acadêmicos Juliano Machado e Mônica Okada da UFPR, pelo apoio técnico.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Siglas, Abreviações e Símbolos

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 Geral	5
2.2 Específicos	5
3 REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 Sepse.....	6
3.1.1 Fisiopatologia	7
3.2 Treinamento físico	16
4 MÉTODO	24
4.1 Amostra	24
4.2 Delineamento Experimental	25
4.2.1 Período de adaptação	25
4.2.2 Formação dos grupos experimentais e procedimentos gerais	25
4.2.3 Teste de esforço máximo e protocolo de treinamento	26
4.2.4 Avaliação funcional da força do músculo esquelético – teste de deambulação	28
4.2.5 Indução da sepse por ligação e punção cecal (CLP).....	29
4.2.6 Sacrifício dos animais, coleta de sangue e de tecidos.....	30

4.3 Parâmetros Analisados	32
4.3.1 Análise bioquímica do lactato e leucócitos sanguíneos	32
4.3.1.1 Lactato sanguíneo	32
4.3.1.2 Leucócitos sanguíneo.....	32
4.3.2 Análise morfológica da musculatura esquelética	33
4.3.2.1 Caracterização histoquímica do músculo esquelético	33
4.3.2.2 Determinação da área de secção transversa e tipo de fibras musculares	35
4.3.3 Análise metabólica energética: enzimas do ciclo de Krebs, cadeia de transporte de elétrons (CTE) e creatinaquinase (CK)	36
4.3.3.1 Enzimas do ciclo de Krebs	37
4.3.3.2 Enzimas da CTE.....	38
4.3.3.3 Enzima CK.....	39
4.3.4 Análise do estresse oxidativo e das enzimas do sistema antioxidante.....	40
4.3.4.1 Medida de TBARS.....	40
4.3.4.2 Medida do dano oxidativo em proteínas	40
4.3.4.3 Atividade da SOD e da CAT	41
4.3.5 Análise do sistema ubiquitina-proteassoma (SUP)	41
4.3.5.1 Análise da atividade do complexo proteassomal 26S.....	41
4.3.5.2 Expressão gênica das E3 ligases Atrogin-1/MAFbx e MuRF-1	42
4.4. Análise estatística dos dados	43
5 RESULTADOS	45
5.1 Medidas de desempenho físico.....	45
5.2 Medidas sanguíneas	46
5.3 Medidas morfológicas.....	47

5.3.1 Massa corporal total	47
5.3.2 Massa úmida e razão massa úmida e seca do músculo tibial anterior	48
5.3.3 Massa dos músculos diafragma, sóleo e plantar	49
5.3.4 Área de secção transversa (AST) do músculo sóleo	50
5.3.5 Área de secção transversa (AST) do músculo plantar	51
5.4 Medidas metabólicas energéticas	52
5.4.1 Enzimas do ciclo de Krebs e CTE	52
5.4.1.1 Diafragma	52
5.4.1.2 Sóleo	54
5.4.1.3 Plantar	56
5.4.2 Enzima CK	58
5.5 Medidas do estresse oxidativo	60
5.5.1 TBARS	60
5.5.2 Carbonil	61
5.6 Medidas das enzimas do sistema antioxidante	62
5.6.1 SOD	62
5.6.2 CAT	63
5.7 Medidas do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (SUP)	64
5.7.1 Medida da atividade do 26S-Proteassoma	64
5.7.2 Medida da expressão gênica da E3 ligase Atrogin-1/MAFbx	65
5.7.3 Medida da expressão gênica da E3 ligase MuRF-1	66
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÕES	82
8 REFERÊNCIAS	83

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fatores de risco envolvidos na perda de massa muscular e na fraqueza adquirida na unidade de terapia intensiva (FAUTI). Adaptado de Shefold, 2010 [1].....9
- Figura 2.** Esquema dos principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da miopatia esquelética observada em pacientes com sepse. A associação da hipoperfusão e da ativação inflamatória culmina na perda de força e atrofia muscular 11
- Figura 3.** Sistema ubiquitina proteassoma (SUP). E1 (proteína ativadora) ativa a ubiquitina (Ub) com gasto de energia. E2 (proteína carreadora) conjuga as ubiquitinas, formando uma cauda de poliubiquitinas. E3 (proteína ligase) liga as ubiquitinas conjugadas à proteína alvo (substrato), que é posteriormente, reconhecida pelo proteassoma 26S e degradada em pequenos peptídeos (liberação). Mono: apenas uma ubiquitina. Multi: cauda com poucas ubiquitinas. Poly: cauda com várias ubiquitinas. Adaptado de Kaiser e Huang, 2005 [2] 13
- Figura 4.** Esquema das principais adaptações musculares esqueléticas desencadeadas pelo treinamento aeróbico. Adaptado de Medeiros et al, 2010 [3]..... 18
- Figura 5.** Mudanças fisiológicas, bioquímicas e moleculares ocorridas nas fibras musculares expostas a atividade contrátil (exercício). Adaptado de Hood, 2001 [4] 19
- Figura 6.** *Desenho Experimental.* Grupos: Sham, grupo não-treinado submetido a falsa cirurgia; ShamT, grupo treinado submetido a falsa cirurgia; CLP, grupo não-treinado submetido a cirurgia de ligação e punção cecal; CLPT, grupo treinado submetido a cirurgia de ligação e punção cecal; CTE = cadeia de transporte de elétrons; CK=creatinaquinase26
- Figura 7.** Treinamento dos ratos em esteira ergométrica.....27
- Figura 8.** Teste de deambulação. **(A)** Patas dos animais em contato com a tinta fresca; **(B)** posicionados em caixa de madeira retangular forrada com papel branco; **(C)** caminhada sobre o papel branco deixando a marca das passadas.28

Figura 9. Técnica de ligação e punção cecal (CLP). A ligação foi realizada na base do colon direito **(a)**, de forma a isolar o ceco e não interromper o fluxo intestinal **(b)**. Entre a ligação e a porção distal do ceco, foi realizada uma punção, atravessando somente um lado do ceco, com uma agulha 14-gauge **(c)**. Adaptado de Buras 2005 [5] 30

Figura 10. Coleta dos músculos esqueléticos estudados. **(A)** Remoção da loja posterior dos músculos. **(B)** Retirada do músculo sóleo. **(C)** Retirada do músculo plantar. **(D)** Músculo diafragma. **(E)** Retirada do músculo tibial anterior. **(F)** Medida da massa dos músculos 31

Figura 11. Caracterização histoquímica do músculo esquelético. Músculos sóleo **(A)** e plantar **(C)** no pH 4,3 com diferenciação das fibras tipo I (escuras), tipo II (mais claras). O oposto é caracterizado no pH 10,3 nos músculos sóleo **(B)** e plantar **(D)** 34

Figura 12. Capacidade de tolerância ao esforço físico representada pela máxima distância percorrida no teste de esforço máximo **(A)**; e, força dos músculos esqueléticos representada pelo índice de deambulação medido no teste de deambulação **(B)**, de ratos wistar dos grupos Não-Treinado e Treinado no momento pré-cirúrgico. Os testes foram realizados após oito semanas de protocolo de treinamento em esteira ergométrica. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram analisados através do teste t de Student. *, $p < 0.05$ vs Não-Treinado 45

Figura 13. Força dos músculos esqueléticos representada pelo índice de deambulação medido no teste de deambulação de ratos wistar dos grupos Sham, ShamT, CLP e CLPT após 48 horas dos procedimentos cirúrgicos. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT 46

Figura 14. Concentração de lactato sanguíneo **(A)** e leucócitos **(B)** após 48 horas dos procedimentos cirúrgicos. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT 47

Figura 15. Diferença da massa corporal entre o momento pré-cirúrgico e após 48 horas da cirurgia. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; §, $p < 0.05$ vs. ShamT 48

Figura 16. Massa do músculo tibial anterior corrigida pelo comprimento da tibia **(A)** e razão massa úmida/seca do músculo tibial anterior **(B)** após 48h da cirurgia. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT 49

Figura 17. Massa dos músculos esqueléticos diafragma **(A)**, sóleo **(B)** e plantar **(C)** corrigidos pelo comprimento da tibia, após 48h da cirurgia. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan 50

Figura 18. Área de secção transversa (AST) das fibras do músculo sóleo. **(A)** AST do total das fibras; **(B)** AST das fibras tipo I; e **(C)** AST das fibras tipo II após 48h da cirurgia. Os grupos foram formados por um número amostral de 4 ratos em cada grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham..... 51

Figura 19 Área de secção transversa (AST) das fibras do músculo plantar. **(A)** AST do total das fibras; **(B)** AST das fibras tipo I; e **(C)** AST das fibras tipo II após 48h da cirurgia. Os grupos foram formados por um número amostral de 4 ratos em cada grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan..... 52

Figura 20. Enzimas do Ciclo de Krebs do músculo diafragma. **(A)** SDH – succinato desidrogenase; **(B)** MDH – malato desidrogenase; **(C)** CS – citrato sintase. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT 53

Figura 21. Enzimas da Cadeia de Transporte de Elétrons (CTE) do músculo diafragma. **(A)** Complexo I; **(B)** Complexo II; **(C)** Complexo II-III; **(D)** Complexo IV. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT 54

Figura 22. Enzimas do Ciclo de Krebs do músculo sóleo. **(A)** SDH – succinato desidrogenase; **(B)** MDH – malato desidrogenase; **(C)** CS – citrato sintase. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT 55

Figura 23. Enzimas da Cadeia de Transporte de Elétrons (CTE) do músculo sóleo. **(A)** Complexo I; **(B)** Complexo II; **(C)** Complexo II-III; **(D)** Complexo IV. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham; #, $p<0.05$ vs. CLP; §, $p<0.05$ vs. ShamT 56

Figura 24. Enzimas do Ciclo de Krebs do músculo plantar. **(A)** SDH – succinato desidrogenase; **(B)** MDH – malato desidrogenase; **(C)** CS – citrato sintase. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham; #, $p<0.05$ vs. CLP; §, $p<0.05$ vs. ShamT 57

Figura 25. Enzimas da Cadeia de Transporte de Elétrons (CTE) do músculo plantar. **(A)** Complexo I; **(B)** Complexo II; **(C)** Complexo II-III; **(D)** Complexo IV. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham 58

Figura 26. Enzima creatina quinase (CK) analisada nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham; #, $p<0.05$ vs. CLP; §, $p<0.05$ vs. ShamT 59

Figura 27. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) analisadas nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham; #, $p<0.05$ vs. CLP; §, $p<0.05$ vs. ShamT 60

Figura 28. Carbonil analisado nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham; #, $p<0.05$ vs. CLP; §, $p<0.05$ vs. ShamT 61

Figura 29. SOD analisado nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham; #, $p<0.05$ vs. CLP; §, $p<0.05$ vs. ShamT62

Figura 30. CAT analisado nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan63

Figura 31. Atividade máxima do 26S-Proteassoma analisada nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham; §, $p<0.05$ vs. ShamT64

Figura 32. Expressão gênica da E3 ligase Atrogin-1/MAFbx analisada nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham; #, $p<0.05$ vs. CLP; §, $p<0.05$ vs. ShamT65

Figura 33. Expressão gênica da E3 ligase MuRF1 analisada nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham; §, $p<0.05$ vs. ShamT66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Primers utilizados para avaliação da expressão gênica em qRT-PCR43

Quadro 2 – Resumo dos principais resultados obtidos no estudo67

LISTA DE SIGLAS, ABREVIações E SÍMBOLOS

ACCP/CCM	American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine
AGL	Ácidos graxos livres
ANOVA	Análise de variância
APACHE II	Sistema classificatório de doenças agudas e crônicas II (<i>Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II</i>)
AST	Área de secção transversa
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase	Enzima que catalisa a hidrólise da ATP
ATP-Na2	Sal disódico de trifosfato de adenosina
Atrogin-1	<i>Atrophy gene-1</i>
C ₂ H ₅ NO ₂	Glicina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CAT	Catalase
CH ₂ O	Formol
CH ₃ COOH	Ácido acético glacial
CH ₃ COONa	Acetato de sódio
CK	Creatinaquinase
CLP	Ligação e punção cecal

COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COSTS	Estudo epidemiológico e econômico do tratamento da sepse em terapia intensiva
CS	Citrato sintase
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
DCIP	Dicloroindofenol
DMO	Disfunção de múltiplos órgãos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EEM	Estimulação elétrica muscular
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo
FAUTI	Fraqueza adquirida na unidade de terapia intensiva
FC	Frequência cardíaca
FOXO	<i>Forkhead transcription factors</i>
GC	Grupo controle
GE	Grupo experimental
GPx	Glutathione peroxidase
GPx	Glutathione peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HMG-I	Proteína do grupo de alta mobilidade I
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva

IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IL1- β	Interleucina 1 β
IL6	Interleucina 6
MuRF-1	<i>Muscle Ring Finger 1</i>
MDH	Malato desidrogenase
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-kB	Fator nuclear kappa B
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfeto de amônio
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
O ₂	Oxigênio
PaCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PAM	Pressão arterial média
PGC-1 α	Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma Coactivator 1alpha
PDH	Piruvato desidrogenase
pH	Potencial hidrogeniônico
SDH	Succinato desidrogenase
Sham	Falsa cirurgia
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SOD	Superóxido dismutase
SUP	Sistema ubiquitina-proteassoma

TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TF	Treinamento físico
TNB	Ácido tionitrobenzóico
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UTI	Unidade de terapia intensiva
UTIs	Unidades de terapia intensiva
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima
VO_2	Volume de oxigênio

RESUMO

Coelho WC. *Efeitos do Treinamento Físico Sobre a Miopatia Esquelética em Modelo Experimental de Sepsis* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: Sepsis é a resposta inflamatória sistêmica secundária a um processo infeccioso de alta incidência e elevada mortalidade. A miopatia esquelética, causada pela sepsis, gera atrofia muscular e fraqueza generalizada que estão relacionadas a disfunção mitocondrial, produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e aumento da degradação proteica. Exercício físico regular, especialmente de predominância aeróbica, tem mostrado efeito protetor ao músculo esquelético contra uma variedade de estressores e em várias patologias. A hipótese testada neste estudo foi de que o treinamento físico, prévio à indução da sepsis, melhora o metabolismo aeróbico e o sistema antioxidante, reduz o estresse oxidativo, diminui a degradação proteica, minimizando a fraqueza e a perda de massa muscular e, por conseguinte, atenuando a miopatia esquelética na sepsis.

OBJETIVO: Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a miopatia esquelética em modelo experimental de sepsis induzida através da técnica de ligação e punção cecal (CLP).

MÉTODOS: Ratos machos Wistar, inicialmente distribuídos em dois grupos: Não-Treinado e Treinado. O grupo Treinado foi submetido a protocolo de treinamento físico (TF), de predominância aeróbica, com duração de oito semanas, em esteira rolante (60 minutos, 5 dias por semana, a 60% da velocidade máxima encontrada em teste de esforço máximo). Ao final do protocolo de TF o grupo Não-Treinado foi dividido em grupo Sham (falsa cirurgia) e CLP (indução da sepsis por ligação e punção cecal); e o grupo Treinado da mesma maneira: ShamT e CLPT, totalizando quatro grupos experimentais. Os quatro grupos foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos e após dois dias sacrificados sendo coletado sangue e retirados os músculos: tibial anterior, sóleo, plantar e diafragma para as análises morfológicas, metabólicas, estresse oxidativo, sistema antioxidante e de degradação proteica.

RESULTADOS: Os animais não treinados induzidos a sepsis através da CLP apresentaram alterações na musculatura esquelética, na maioria das variáveis relacionadas a miopatia esquelética. O TF prévio a indução de sepsis propiciou a manutenção da força muscular, da massa muscular e da área de secção transversa das fibras musculares; a atividade das enzimas metabólicas aeróbicas também foram mantidas, e no sóleo, houve uma tendência forte a aumento nas enzimas do ciclo de Krebs. A atividade da enzima creatinaquinase foi mantida nos músculos diafragma e sóleo e diminuiu no plantar. O TF foi eficiente para evitar o estresse oxidativo em lipídios e proteínas nos três músculos estudados, porém houve aumento da atividade enzimática da superóxido dismutase somente no músculo sóleo. O TF foi capaz de manter a atividade do 26S-proteossoma e diminuir a expressão gênica de Atrogin-1 no sóleo, porém não proporcionou diferenças significativas na expressão gênica de MuRF-1 nos três músculos estudados.

CONCLUSÃO: Treinamento físico prévio a CLP atenuou os efeitos deletérios da sepsis sobre a musculatura esquelética nesse modelo experimental.

Descritores: 1.Sepsis 2.Estresse oxidativo 3.Miopatias 4.Exercício físico 5.Músculo esquelético 6.Metabolismo energético

SUMMARY

Coelho WC. *Effects of Physical Training on Skeletal Myopathy in an Experimental Sepsis Model* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUCTION: Sepsis is a systemic inflammatory response secondary to an infectious process of high incidence and mortality. Skeletal myopathy caused by sepsis generates muscular atrophy and generalized weakness that are related to mitochondrial dysfunction, exacerbated production of reactive oxygen species and increase in protein degradation. Regular physical exercise, especially the predominantly aerobic type, has shown a protective effect on skeletal muscle against a variety of stressors and in various pathologies. The hypothesis tested in this study was that physical training before the induction of sepsis, would improve aerobic metabolism and the antioxidant system, reduce oxidative stress, diminish protein degradation, thereby minimizing weakness and loss of muscle mass, consequently attenuating skeletal myopathy in sepsis. **OBJECTIVE:** To evaluate the effects of aerobic exercise training on skeletal myopathy in an experimental model of sepsis induced by cecal ligation and perforation (CLP). **METHODS:** Male Wistar rats, were initially divided into 2 groups: Trained and Untrained. The Trained group was submitted to an aerobic exercise training protocol (ETP), on a treadmill, lasting eight weeks (60 minutes, 5 days a week, 60% of the maximum running speed obtained in the graded treadmill test). At the end of the ETP the Untrained group was divided into Sham group (sham surgery) and CLP (sepsis induced by cecal ligation and perforation) and the Trained group was subjected in the same way to: ShamT and CLPT, resulting in four experimental groups. The four groups were submitted to surgical procedures and two days after surgery, the animals were euthanized. Blood was collected and anterior tibialis, soleus, diaphragm and plantaris muscles were harvested for the morphological, metabolic, oxidative stress, antioxidant system and protein degradation analysis. **RESULTS:** In the untrained animals, sepsis induced by CLP showed alterations in skeletal muscle variables related to skeletal myopathy. The ETP before induction of sepsis led to the maintenance of muscle strength, muscle mass and cross-sectional area of muscle fiber. Activity of aerobic metabolic enzymes was also retained, and in the soleus there was a strong tendency towards increase in enzymes of Krebs cycle. Creatine kinase enzyme activity in the diaphragm and soleus muscles was maintained, and was decreased in the plantaris muscle. ETP was effective in preventing oxidative stress in lipids and proteins in the three muscles studied, however there was increase in superoxide dismutase activity only in the soleus muscle. ETP was capable of maintaining 26Sproteasome activity and decreasing Atrogin-1 gene expression in the soleus muscle, however, revealed no significant differences in MuRF-1 gene expression in the three muscle studied. **CONCLUSION:** Physical training before CLP attenuated the deleterious effects of sepsis on skeletal muscle in this experimental model.

Descriptors: 1.Sepsis 2.Oxidative Stress 3.Myopathy 4.Physical exercise 5.Skeletal muscle 6.Energetic metabolism

1. INTRODUÇÃO

A incidência de sepse grave nos Estados Unidos da América gira em torno de 750.000 casos/ano resultando em 215.000 mortes/ano. No Brasil, o estudo BASES - *Brazilian Sepsis Epidemiological Study* - demonstrou que aproximadamente 25% dos pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) brasileiras apresentam critérios diagnósticos para sepse grave e choque séptico, com taxas progressivas de mortalidade de sepse (34,7%), sepse grave (47,3%) e choque séptico (52,2%) [6-10].

Sepse resulta da resposta inflamatória sistêmica secundária a infecção, que se manifesta em diferentes espectros de gravidade. A sepse grave é a associação do quadro inflamatório infeccioso (sepse) com pelo menos uma disfunção orgânica. A sua forma mais grave, o choque séptico, cursa com colapso do sistema cardiovascular, hipoperfusão tecidual grave, culminando com disfunção de múltiplos órgãos (DMO) [11,12].

Entre as disfunções orgânicas mais prevalentes, a miopatia destaca-se pelo potencial de acarretar uma série de sequelas de curto e longo prazo. De fato, a musculatura esquelética é particularmente afetada pela sepse, por ser um dos primeiros tecidos a sofrer com a hipoperfusão durante a fase aguda da doença e um dos últimos a ser reperfundido após o tratamento [13, 14]. Por outro lado, a liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL6 e IL1- β agredem diretamente as células e/ou indiretamente através do desequilíbrio no estado redox celular [15], o qual promove a

liberação de fatores pró-apoptóticos, a partir da mitocôndria [16], ativando sistemas de degradação proteica [17]. A associação destes fatores resulta em redução de massa muscular, debilidade das fibras residuais e falta de força. A miopatia que se segue apresenta-se com manifestações que variam desde paresia leve até tetraplegia flácida, podendo perdurar por meses. Esta limitação funcional é observada em grande parte dos pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) [18-20]. A fraqueza muscular pode implicar no surgimento de úlceras de decúbito, aumento do tempo de ventilação mecânica e aumento do custo direto e indireto do tratamento. Além disso, a ocorrência da miopatia induzida por sepse está associada a elevadas taxas de morbi-mortalidade [21, 22].

Considerando que a miopatia pode co-existir com neuropatia [23], há a necessidade de se avaliar conjuntamente as duas funções em pacientes gravemente enfermos. Esta abordagem promoveria o melhor entendimento da fisiopatologia das desordens neuromusculares adquiridas na UTI e permitiria o desenvolvimento de estratégias para proteger os pacientes de seqüelas neuromusculares após doenças graves. Em adição, há carência de pesquisas em áreas como fisiopatologia das anormalidades neuromusculares adquiridas na UTI [24], miopatia induzida pela sepse, bem como estudos eletrofisiológicos e histopatológicos do tecido nervoso e muscular [25].

A sepse é uma síndrome sistêmica complexa caracterizada pelo desequilíbrio entre as respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias do organismo a presença de um patógeno em áreas estéreis [26]. Portanto, há

grande atividade do sistema imunológico, que produz espécies reativas de oxigênio (ERO) tendo como função primária o combate aos microorganismos. Porém, essa ação excessiva do sistema imunológico acaba gerando desequilíbrio entre formação e eliminação de ERO, já que o principal sistema de controle, as enzimas antioxidantes, não é suficiente para proteger a célula, gerando o estresse oxidativo que contribui para o dano celular especialmente de proteínas, DNA e lipídios [13, 15, 27, 28]. O estresse oxidativo [29] e as disfunções mitocondrias [30] têm papel destacado nos problemas musculares em várias patologias, inclusive na sepse [29, 31, 32]. De fato, disfunções mitocondriais têm sido associadas à fadiga muscular tanto em modelos animais quanto em pacientes sépticos [30, 32, 33].

Exercício físico regular, especialmente de predominância aeróbica, tem mostrado efeito protetor ao músculo esquelético contra uma variedade de estressores, inclusive estresse oxidativo [34, 35]. O mecanismo fisiológico que explica essa proteção está relacionado principalmente ao aprimoramento do sistema enzimático antioxidante [36-38]. O treinamento físico também melhora a função mitocondrial e aumenta o número de mitocôndrias no músculo esquelético [4, 39]. O efeito resultante é o aumento da eficiência do sistema antioxidante e do metabolismo aeróbico, depurando as ERO em diferentes situações [39, 40]. O trofismo muscular também é particularmente beneficiado com o treinamento, já que estimula a síntese e diminui a degradação protéica [41]. Portanto, o treinamento aeróbico gera

uma cascata de adaptações que modulam o fenótipo das fibras musculares [34, 35, 42].

Considerando que os benefícios do treinamento físico têm sido amplamente estudados em diferentes patologias como insuficiência cardíaca e câncer [43-45], na sepse, esses estudos ainda são bastante incipientes [46-50] principalmente considerando músculo esquelético [51, 52].

Portanto, a hipótese testada neste estudo foi de que o treinamento físico, prévio a indução da sepse, melhora o metabolismo aeróbico e o sistema antioxidante, reduz o estresse oxidativo, diminui a degradação proteica, minimizando a fraqueza e a perda de massa muscular e, por conseguinte, atenuando a miopatia esquelética na sepse.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a miopatia esquelética em modelo experimental de sepse induzida através da técnica de ligação e punção cecal (CLP).

2.2 Específicos

Avaliar o efeito do treinamento físico na capacidade de tolerância ao esforço físico e na força dos músculos esqueléticos nos grupos experimentais.

Estudar o efeito do treinamento físico sobre parâmetros morfológicos de atrofia muscular no grupo submetido à CLP.

Avaliar o efeito do treinamento físico sobre parâmetros do metabolismo energético muscular no grupo submetido à CLP.

Avaliar o efeito do treinamento físico sobre parâmetros do estresse oxidativo muscular no grupo submetido à CLP.

Avaliar o efeito do treinamento físico sobre parâmetros do sistema antioxidante muscular no grupo submetido à CLP.

Avaliar o efeito do treinamento físico sobre parâmetros do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (SUP) do músculo no grupo submetido à CLP.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Sepses

Sepses é uma das principais causas de morte no mundo, em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) não cardiológica [6, 9, 53]. A incidência de sepses grave nos Estados Unidos da América, em 1995, girava em torno de 750.000 casos/ano resultando em 215.000 mortes/ano [6, 9]. No Brasil, o estudo BASES - *Brazilian Sepsis Epidemiological Study* - demonstrou que aproximadamente 25% dos pacientes internados nas UTIs brasileiras apresentavam critérios diagnósticos para sepses grave e choque séptico, com taxas progressivas de mortalidade de sepses (34,7%), sepses grave (47,3%) e choque séptico (52,2%) [9].

Além de elevadas taxas de incidência e de mortalidade, os custos relacionados ao tratamento da sepses também são elevados. Estima-se que nos Estados Unidos os custos hospitalares envolvidos no tratamento de pacientes com sepses grave chegue a 17 bilhões de dólares por ano. No Brasil, o estudo COSTS mostrou que cada paciente tratado em UTIs brasileira consome cerca de 10 mil dólares por internação e que pacientes não sobreviventes gastam consistentemente mais que pacientes sobreviventes [10]. Se considerarmos este custo direto representa um terço do custo hospitalar e que o número de pacientes com sepses grave no país é de 500 mil a cada ano, o custo total anual seria aproximadamente de 10 bilhões de dólares.

3.1.1 Fisiopatologia

O *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/CCM)*, definiu sepse como sendo a resposta inflamatória sistêmica secundária a um processo infeccioso e estabeleceu critérios claros para o diagnóstico da sepse e outras co-morbidades [11, 12].

O paciente com diagnóstico de sepse apresenta dois ou mais critérios da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) secundários a um processo infeccioso. A presença de dois ou mais dos seguintes critérios definem SIRS: a) febre ($>38^{\circ}\text{C}$) ou hipotermia ($<36^{\circ}\text{C}$); b) taquicardia (> 90 bpm); c) taxa respiratória (>20 respirações/min ou $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg); d) leucocitose ($> 12.000/\text{mm}^3$) ou leucopenia ($< 4.000/\text{mm}^3$) ou $> 10\%$ de células imaturas (bastões). As formas mais graves da doença são sepse grave, que é associação do quadro inflamatório infeccioso (sepse) com pelo menos uma disfunção orgânica, e choque séptico, que cursa com colapso do sistema cardiovascular, hipoperfusão tecidual grave, culminando com disfunção de múltiplos órgãos (DMO) [11, 12].

Suscintamente, na fisiopatologia da sepse, há a ligação de componentes bacterianos, como os lipolissacarídeos de bactérias gram-negativas, que se ligam a receptores da membrana celular do hospedeiro, como o CD14. Esta interação, mediada por receptores transmembrana Toll, estimula a produção de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios a partir de células do sistema imune. A interação entre os diversos mediadores leva

a depressão miocárdica, alteração da função vascular e dano em órgãos-alvo do paciente, resultando muitas vezes em morte por hipotensão refratária ou falência de múltiplos órgãos [54]. De forma resumida, os principais mediadores são: (a) citocinas especialmente as derivadas de macrófagos (IL-1 β , TNF- α e IL-6); (b) óxido nítrico (NO); (c) metabólitos do ácido aracdônico; (d) espécies reativas de oxigênio (ERO); e (e) proteínas do grupo de alta mobilidade I (HMG-I) [27, 55, 56]

Muitos pacientes, em fases distintas de sua evolução, apresentam aumento do índice cardíaco (apenas após reposição volêmica), redução da resistência vascular periférica e ativação do catabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas musculares, objetivando fornecer aminoácidos para serem utilizados na gliconeogênese e para a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado [57, 58]. A degradação de proteínas musculares na sepse somada a ação direta de medicamentos, como corticóides e bloqueadores neuromusculares, resultam no desenvolvimento da miopatia esquelética, caracterizada principalmente por grande perda de massa muscular e força. [1, 59, 60].

Atualmente, é consenso na literatura à utilização do termo fraqueza adquirida na unidade de terapia intensiva (FAUTI) e está associado a várias patologias, inclusive a sepse [61]. Shefold et al (2010) propuseram uma representação esquemática dos fatores de risco associados à FAUTI e à perda de massa muscular (**Figura 1**). Na maioria das vezes, FAUTI está acompanhada por perda de massa muscular, porém a perda de massa

muscular, não está necessariamente associada à FAUTI. Sepses, habitualmente, induz as duas situações. [1].

A perda de massa muscular pode ser desencadeada por outras condições incluindo desuso, denervação, desnutrição, câncer, insuficiência cardíaca e disfunção renal, sendo que essas condições podem ser secundárias ou associadas à sepse [61]. Imobilização prolongada, utilização de sedativos, outras disfunções orgânicas, neoplasias e uso de esteroides são outros fatores associados. Há também desequilíbrio entre síntese e degradação protéica (diminuição de síntese e/ou aumento da degradação), causando perda de massa muscular, sendo considerado o principal mecanismo da atrofia muscular [61, 62]. (**Figura 1**).

Figura 1. Fatores de risco envolvidos na perda de massa muscular e na fraqueza adquirida na unidade de terapia intensiva (FAUTI). Adaptado de Shefold, 2010 [1].

Na sepse, a etiologia da atrofia muscular tem sua origem no aumento de fatores catabólicos, como citocinas e glicocorticóides, e diminuição de fatores anabólicos, como insulina e IGF-1 [63]. A sepse, como outras doenças inflamatórias, promove também liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO), os quais são responsáveis pela fagocitose de patógenos por células do sistema imune. Por consequência, há produção sistemática de radicais livres, principalmente devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL6 e IL1- β , gerando um desequilíbrio no estado redox da célula e promovendo o estresse oxidativo [15] (**Figura 2**).

As ERO promovem sinalização intracelular para ativação do fator de transcrição NF-kB, conhecido por transcrever genes pró-inflamatórios. Além disso, as ERO podem promover a liberação de fatores pró-apoptóticos a partir da mitocôndria, como o citocromo c, necessário para a ativação da caspase-3. Todos esses efeitos contribuem para o quadro inflamatório que se estabelece na sepse e colaboram para a progressão nas suas formas mais graves, promovendo coagulopatias, danos celulares e DMO [16].

A produção excessiva de ERO também pode sobrecarregar as defesas endógenas de antioxidantes e levar à hidroxilação de DNA, oxidação de proteínas, peroxidação de lipídios e depleção de tiol com conseqüências adversas para a homeostasia celular [13, 15, 27, 28]. Além da sepse, a oxidação/ carbonilação de proteínas têm sido foco de estudo em doenças crônico-degenerativas e no processo de envelhecimento, em vários tecidos, inclusive no músculo esquelético, devido a sua natureza irreversível [64, 65]

e por estar ligado diretamente a sistemas intracelulares de degradação proteica [66].

Figura 2. Esquema dos principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da miopatia esquelética observada em pacientes com sepse. A associação da hipoperfusão e da ativação inflamatória culmina na perda de força e atrofia muscular.

O estado pró-oxidante da célula também pode alterar a estrutura e função das proteínas e ácidos nucleicos, resultando em lesão e em circunstâncias extremas, morte celular. A formação de ERO, por sua vez, parece ser o mecanismo chave da atrofia muscular [67], pois induz disfunção dos miofilamentos contráteis [68] e antecipação da fadiga [69]. Confirmando essa relação, estudos têm mostrado efeitos atenuantes na atrofia e/ou disfunção musculares com a utilização de antioxidantes [70, 71].

A perda de massa muscular na sepse é causada principalmente pelo aumento da degradação protéica através dos sistemas ubiquitina proteassoma (SUP) [17, 72, 73], lisossomal [74, 75] calpaínas dependentes de cálcio e caspases [76, 77]. As caspases e as calpaínas são responsáveis pela clivagem de proteínas miofibrilares antes da degradação no proteassoma [78], pois sem essa clivagem o proteassoma não pode degradar proteínas miofibrilares intactas.

A principal função do SUP é controlar a qualidade das proteínas através da degradação seletiva de proteínas oxidadas ou mal-enoveladas evitando o acúmulo destas no ambiente intracelular. O SUP possui um sistema de reconhecimento dessas proteínas composto pelas enzimas chamadas “ligases”, pela proteína ubiquitina, pelo complexo proteassomal 26S e pelo ATP [79]. O processo de ativação da proteína ubiquitina é dependente de ATP e é iniciado através da enzima E1, proteína ativadora, que em seguida é transferida para a E2, proteína carreadora, que conjuga as moléculas de ubiquitina [80, 81]; na última etapa, a E3, proteína ligase, conjuga a sequência de ubiquitinas a proteína alvo, que é reconhecida pelo

complexo proteassomal 26S degradando a proteína em pequenos peptídeos de 8-12 aminoácidos [79]. Esse mecanismo do funcionamento do SUP é ilustrado na **Figura 3**.

Figura 3. Sistema ubiquitina proteassoma (SUP). E1 (proteína ativadora) ativa a ubiquitina (Ub) com gasto de energia. E2 (proteína carreadora) conjuga as ubiquitinas, formando uma cauda de poliubiquitinas. E3 (proteína ligase) liga as ubiquitinas conjugadas à proteína alvo (substrato), que é posteriormente, reconhecida pelo proteassoma 26S e degradada em pequenos peptídeos (liberação). Mono: apenas uma ubiquitina. Multi: cauda com poucas ubiquitinas. Poly: cauda com várias ubiquitinas. Adaptado de Kaiser e Huang, 2005 [2].

O complexo proteassomal 26S é composto por duas subunidades; a subunidade regulatória 19S, que com gasto de ATP, faz o reconhecimento e o desenovelamento da cauda ubiquitinada ligada a proteína alvo; e a subunidade catalítica 20S, que conta com três sítios catalíticos que fazem diferentes clivagens [82]; o sítio $\beta 1$ (ou peptidilglutamina): cliva ligações peptídicas após ácido glutâmico; o sítio $\beta 2$ (ou tripsina): degrada aminoácidos lisina e arginina próximos ao grupo C-terminal; o Sítio $\beta 5$ (ou quimiotripsina): degrada tirosina, triptofano e fenilalanina próximos ao grupo C-terminal; e ainda pode clivar outros aminoácidos, como a leucina, caso permaneça ativo por um longo período (**Figura 3**).

Estudos têm demonstrado que em estados catabólicos como jejum, sepse, denervação e câncer, o SUP é ativado na musculatura esquelética [17, 72, 83] e que na atrofia muscular esquelética o SUP precisa estar necessariamente ativado [84]. Normalmente na miopatia esquelética as E3 ligases Atrogin-1 e MuRF1 apresentam aumentos significativos na expressão gênica e proteica confirmando estados de atrofia [62]. Porém, nos diferentes processos de atrofia nem todos os componentes do SUP estão super expressos [85]. A explicação para esse fato parece estar relacionada a estimulação de diferentes vias de sinalização, que não são ativadas da mesma maneira e ao mesmo tempo, promovendo aumento de determinados componentes do sistema, enquanto outros permanecem inalterados [86].

Na sepse, além do aumento da degradação [17, 75] há uma diminuição da síntese proteica no músculo esquelético [87, 88] que inibi preferencialmente a síntese de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas nos músculos de contração rápida [89]. Há evidências de que há amplificação local de citocinas pró-inflamatórias no músculo, sendo um possível agravante na diminuição da síntese protéica [60].

O hipermetabolismo somado a ineficiência metabólica na sepse, também contribui para a atrofia muscular, depletando estoques de glicogênio e ácidos gráxos, bem como utilizando aminoácidos para obtenção de energia. Portanto, na sepse para manter a função de células envolvidas na resposta inflamatória do hospedeiro, há adaptações na regulação da provisão de energia [90].

O metabolismo anormal de glicose no músculo esquelético na sepse é expresso pela intolerância à glicose e resistência à insulina [88, 90]. Esta resposta hiperglicêmica inicial reflete não apenas a gliconeogenese hepática promovida por hormônios contra-reguladores, como o glucagon, mas também uma rápida depleção do glicogênio do fígado [57, 58].

Além das alterações na utilização dos carboidratos, alterações na disponibilidade e metabolismo de aminoácidos têm sido descritas na sepse. Sob a influência de hormônios contra-reguladores, glicorticóides e citocinas, a proteólise dos músculos esqueléticos resulta em liberação sistêmica de aminoácidos, incluindo glutamina e alanina [89, 91].

Como acontece com carboidratos e proteínas, o metabolismo dos ácidos graxos livres (AGL) também muda na sepse, começando com um aumento inicial na concentração plasmática de AGL, que reflete o aumento da lipólise de tecido adiposo [91, 92]. À medida que a sepse progride, a concentração plasmática e o *turnover* de AGL geralmente diminui. A etiologia desta redução é provavelmente multifatorial e representa aumento da captação de glicose, resistência à insulina, aumento da concentração de lactato que estimula a reesterificação dos AGL [93].

Em acréscimo à modificação da utilização dos substratos energéticos, a resposta inflamatória desencadeada por exposição a produtos microbianos, pode prejudicar a mitocôndria e, em consequência, o metabolismo oxidativo mitocondrial e, portanto, causa as alterações metabólicas relatadas durante a sepse [30, 94]. Assim, evidências científicas sustentam a hipótese de que tanto lesão mitocondrial como a maior geração

de ERO pela mitocôndria contribui para a lesão celular e a DMO na sepse [94].

3.2 Treinamento físico

A prática regular de exercícios físicos traz muitos benefícios para a saúde incluindo baixa ameaça de todas as causas de mortalidade juntamente com risco reduzido de doenças cardiovasculares, câncer e diabetes [95-98]

O treinamento físico gera muitas adaptações sistêmicas e localizadas no organismo [34, 35, 99]. O treinamento de predominância aeróbica, caracterizado por atividades de longa duração de baixa a média intensidade, proporciona melhoria na função cardiovascular, no metabolismo e trofismo muscular, aumentando a tolerância ao esforço físico [44, 100, 101]. A melhora da resistência física aeróbica é resultado de maior oferta de oxigênio aos tecidos e de utilização mais eficiente pelos músculos exercitados que apresentam maior número de capilares por fibra muscular, bem como maior densidade e atividade mitocondrial [100]. Estas não são apenas grandes vantagens para esforços atléticos, mas também é claramente importante para a melhora da qualidade de vida de indivíduos previamente sedentários e dos envolvidos em reabilitação física [99].

No músculo esquelético, as principais adaptações ao treinamento físico aeróbico podem ser observadas na **Figura 4**. O aumento da

capacidade física após período de treinamento está relacionado a várias adaptações moleculares, bioquímicas, estruturais e funcionais da musculatura esquelética [102]; por exemplo, o aumento da densidade mitocondrial, da atividade de enzimas oxidativas e da modulação da distribuição dos tipos de fibras estão associados a um aumento da expressão da proteína PGC-1 α . Já o aumento da capilarização muscular está diretamente relacionado a maior expressão de VEGF; a diminuição das ERO está relacionada a um aumento da função mitocondrial que com isso também diminui a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA. Outro aspecto importante é que o treinamento aumenta a expressão de IGF-1 que estimula a síntese protéica e diminui a expressão de citocinas próinflamatórias que são grande fonte de geração de ERO [41]. Portanto, o treinamento aeróbico gera uma cascata de adaptações que modulam o fenótipo das fibras musculares [3, 102].

Figura 4. Esquema das principais adaptações musculares esqueléticas desencadeadas pelo treinamento aeróbico. Adaptado de Medeiros et al, 2010 [3].

As adaptações fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas fibras musculares expostas à atividade contrátil são tempo dependentes. Considerando a biogênese mitocondrial, a magnitude destas mudanças depende do tipo de fibra muscular, da intensidade e da duração do estímulo do exercício aeróbico [103-105]. Por exemplo, em segundos de atividade contrátil, já é possível observar aumento do *turnover* de ATP muscular, do

cálcio no citosol e na mitocôndria e, ainda, aumento do transporte de elétrons e do consumo de oxigênio (VO_2). Após semanas é possível observar adaptações metabólicas consistentes com alteração de fenótipo das fibras musculares exercitadas (**Figura 5**).

Figura 5. Mudanças fisiológicas, bioquímicas e moleculares ocorridas nas fibras musculares expostas a atividade contrátil (exercício). Adaptado de Hood, 2001[4].

As adaptações mitocondriais ocorrem somente nas fibras musculares que foram recrutadas durante a sessão de exercício, sendo consistente com a ideia de que o estímulo para a biogênese mitocondrial tem origem na atividade contrátil do músculo, independente de influências humorais [4]. O resultado final do efeito do treinamento aeróbico sobre a biogênese mitocondrial da fibra é de que há melhora na capacidade de consumo de oxigênio por grama de tecido [106, 107]. Importante salientar que o músculo esquelético tem papel central no controle do metabolismo corporal na saúde e na doença. As diversas funções que os músculos exercem são controladas

através de vias de sinalização que possibilitam as fibras musculares responderem as mudanças metabólicas e demandas funcionais do organismo [102]. A premissa de que as miofibrilas remodelam e modificam seus fenótipos de acordo com as necessidades do organismo está comprovada por vários estudos [108, 109].

Durante as últimas três décadas, o conhecimento sobre as implicações biológicas do estresse induzido pelo exercício se expandiu rapidamente. Atualmente, se sabe que altos níveis de ERO podem danificar os componentes celulares, porém baixos para moderados, desempenham vários papéis regulatórios nas células, tais como controle da expressão gênica, regulação das vias de sinalização celular e modulação de força muscular esquelética [110-112]. O exercício aeróbico tem mostrado efeito protetor contra uma variedade de estressores, incluindo o estresse oxidativo [34, 35].

Os benefícios do treinamento físico têm sido amplamente estudados em diferentes patologias como insuficiência cardíaca e câncer [43, 45, 113]. Na sepse, esses estudos ainda são bastante incipientes, e considerando músculo esquelético, treinamento e sepse, é praticamente nulo. Pode-se listar alguns estudos como o de DeBlieux et al (1989) que avaliaram se 12 semanas de treinamento na esteira ergométrica, prévio à sepse, poderia proteger da disfunção miocárdica. Medidas de frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), catecolaminas plasmáticas, desempenho do miocárdio, e adenosina monofosfato cíclico (cAMP) no miócito isolado foram realizadas. Débito cardíaco e pressão arterial sistólica foram 24% e 32%

maiores no grupo treinado do que no sedentário. O trabalho cardíaco no grupo treinado séptico caiu 32%, porém no sedentário séptico caiu 45%. A cAMP estava reduzida nos miócitos dos grupos sépticos sedentários, porém isso não aconteceu no grupo séptico treinado. As catecolaminas plasmáticas apresentaram níveis de 5 a 15 vezes maiores no grupo séptico sedentário comparado com os outros grupos. Esses dados sugerem que a proteção ao miocárdio está relacionada a níveis mais baixos de catecolaminas modulados pelo efeito do treinamento [47]. Em outro estudo, os efeitos da sepse sobre a resposta metabólica ao exercício em ratos foram avaliados. Depois de canular a artéria carótida, foram medidos nos três grupos experimentais (controle, infecção por gram-negativo e por gram-positivo), durante exercício submáximo e máximo, a FC, a PAM, gasometria arterial e o estado ácido-base. Os resultados das variáveis metabólicas e hemodinâmicas, medidos durante essas duas situações de exercício, nos diferentes grupos foram semelhantes. Os autores concluíram que esses resultados não sustentam a afirmação de que a bacteremia, gram-positiva e/ou negativa, resulta em disfunção cardíaca durante a sepse precoce [46]. Starkie et al (2003) testaram a hipótese de que a interleucina IL-6, bem como o exercício físico, inibem a produção de TNF- α estimulada pela endotoxina. Os experimentos foram realizados em oito homens saudáveis em três situações: em repouso (controle), pedalando uma bicicleta por três horas (exercício) e com infusão de IL-6 humano recombinante (rhIL-6) por três horas em repouso; endotoxina de *E. coli* (0,06 ng/kg) intra venosa foi utilizada para induzir inflamação amena. No grupo controle, TNF- α

aumentou significativamente em resposta à endotoxina; em contraste, durante o exercício, que resultou em aumento de IL-6 e no grupo rhIL-6 a indução de TNF- α pela endotoxina foi totalmente amenizada. Concluiu-se que exercício físico e infusão de rhIL-6, em concentrações fisiológicas, inibiu a produção de TNF- α , em humanos, induzida pela endotoxina. Esses dados forneceram evidência experimental de que o exercício físico media a atividade antiinflamatória, e sugere que o mecanismo inclui a IL-6, que é produzida e liberada pelos músculos exercitados e assim suprime a elevação de TNF- α [48]. Também Chen et al (2007) estudaram em modelo experimental, o efeito de um protocolo de treinamento aeróbico de quatro semanas, prévio à indução da sepse, sobre variáveis cardiovasculares, inflamatórias, bioquímicas e anatômicas. Os resultados encontrados foram que o treinamento atenuou as respostas fisiopatológicas da sepse, como por exemplo, hipotensão arterial sistêmica, taquicardia, anemia, aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-1 β) e protegeu os órgãos de lesões induzidas pela sepse [49]. De Araújo et al (2012) estudaram o efeito do treinamento prévio a sepse sobre a lesão de órgãos em ratos. Eles concluíram que exercício regular de intensidade moderada antes da sepse reduziu o risco de lesões no pulmão e outros órgãos, e ainda, aumentou a sobrevivência dos animais [50]. Considerando músculo esquelético, sepse e exercício, Gerovasili et al (2009) investigaram se a estimulação elétrica muscular (EEM) conseguiria preservar a massa muscular de pacientes graves internados na UTI com escore APACHE II $\geq$ 13. Os 26 pacientes admitidos no estudo foram divididos em grupo controle e grupo EEM, que foi

submetido a sessões diárias de 55 minutos de EEM no reto femural e no vasto intermédio durante sete dias. Os resultados indicaram que a EEM conseguiu preservar a massa muscular [51]. Já Poulsen et al (2011) submeteram oito homens adultos com 72 horas de diagnóstico de choque séptico, a sete sessões de 60 minutos de EEM no quadríceps de uma das pernas. A massa muscular do quadríceps da perna experimental e a da perna controle foi avaliada através de tomografia computadorizada. O estudo concluiu que houve diminuição média de 18% do volume do quadríceps das duas pernas (experimental e controle) em uma semana e que a perda de massa muscular não foi afetada pela EEM [52]. Giannesini et al (2008) estudaram o efeito da endotoxemia sobre o suprimento de energia no músculo gastrocnêmio de ratos durante sessões de EEM e os resultados demonstraram que na fase aguda da sepse, as alterações metabólicas do músculo em repouso não têm impacto sobre o suprimento de energia no músculo em exercício [114],

Portanto, a hipótese testada neste estudo foi de que o treinamento físico, prévio a indução da sepse, melhora o metabolismo aeróbico e o sistema antioxidante, reduz o estresse oxidativo, diminui a degradação proteica, minimizando a fraqueza e a perda de massa muscular e, por conseguinte, atenuando a miopatia esquelética na sepse.

4. MÉTODO

4.1 Amostra

Os experimentos foram realizados em ratos machos da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade do Vale do Itajaí (Univali), com idade de 10 semanas, pesando entre 300 e 350 g.

Os ratos foram mantidos em gaiolas no Biotério Central da Universidade da Região de Joinville (Univille), com temperatura entre 22 e 24 graus °C, e ciclo claro-escuro normal 12:12h. Água e comida (Nuvilab® Nutrientes Ltda) foram administradas *ad libidum*. O treinamento e a cirurgia foram realizados em laboratórios anexos ao biotério e as análises em laboratórios de pesquisa da Universidade do Extremo Sul de Santa Catarina (UNESC), na Universidade Federal do Paraná (UFPR) e na Universidade de São Paulo (USP).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (www.cobea.org.br), sendo que os cuidados animais e protocolos utilizados nesta pesquisa foram aprovados pelo comitê de ética da Univille (protocolo n. 008-08 – COEA).

4.2. Delineamento Experimental

4.2.1 Período de adaptação

Todos os animais passaram por uma semana de adaptação. No primeiro dia, os ratos foram pesados e nos três dias subsequentes foram submetidos a 10 minutos de exercício em esteira ergométrica com velocidades variadas. No quinto dia, foi realizado o primeiro teste de esforço máximo para encontrar a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) de corrida de cada rato.

4.2.2 Formação dos grupos experimentais e procedimentos gerais

Após este período de adaptação, os 48 animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: (1) Não-Treinado e (2) Treinado. O grupo Treinado foi submetido a oito semanas de protocolo de treinamento com cinco sessões semanais de uma hora (protocolo descrito posteriormente) e o grupo Não-Treinado, durante essas oito semanas, foi submetido a 10 minutos semanais de caminhada na esteira. Após a realização ou não do protocolo de treinamento, realizou-se o último teste de esforço máximo nos dois grupos (Não-Treinado e Treinado). No mesmo dia, os animais de cada grupo (Não-Treinado e Treinado) foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Sham (falsa cirurgia) e CLP (indução de sepse por ligação e punção cecal). Portanto, após essa fase, o desenho experimental foi composto por quatro grupos: (1) **Sham**, do grupo Não-Treinado; (2) **ShamT** do grupo Treinado; (3) **CLP**, do grupo Não-Treinado; e, (4) **CLPT**, do grupo Treinado. Os grupos CLPs foram compostos por maior número de ratos ($n=17$) em

razão da maior probabilidade de morte e os grupos Shams foram menores ($n=7$), totalizando os 48 animais submetidos à fase anterior do experimento. A cirurgia foi realizada 72 horas após o último teste de esforço máximo. Nos dois dias subsequentes à cirurgia, a comida foi controlada (*per-feed*) e a água foi servida *ad libidum* e todos os animais foram pesados diariamente, sendo sacrificados após 48 horas dos procedimentos cirúrgicos (**Figura 6**).

Figura 6. *Desenho Experimental.* Grupos: Sham, grupo não-treinado submetido a falsa cirurgia; ShamT, grupo treinado submetido a falsa cirurgia; CLP, grupo não-treinado submetido a cirurgia de ligação e punção cecal; CLPT, grupo treinado submetido a cirurgia de ligação e punção cecal; CTE = cadeia de transporte de elétrons; CK=creatinaquinase.

4.2.3 Teste de esforço máximo e protocolo de treinamento

Primeiramente os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo, iniciando com velocidade de 6 m/min com incrementos de 3 m/min a cada 3 minutos, encontrando assim a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) de corrida dos animais. A partir deste teste, o grupo de Treinados foi submetido a um protocolo de treinamento físico de predominância aeróbica durante oito

semanas em esteira rolante. O treinamento físico foi realizado a 60% da $V_{\text{máx}}$, com sessões diárias de 60 minutos, cinco dias por semana; sendo que na primeira semana, as sessões foram um pouco mais curtas, com duração progressiva de 30 a 45 minutos. Ao final da quarta semana, o grupo foi submetido novamente ao teste de esforço máximo, para reavaliação da intensidade do exercício para as próximas quatro semanas de protocolo de treinamento [115]. Por fim, após o período de oito semanas foi aplicado outro teste de esforço máximo nos dois grupos (Não-Treinado e Treinado). Durante as oito semanas, o grupo Não-Treinado permaneceu em repouso, sendo apenas submetidos a 10 minutos semanais de caminhada na esteira em velocidade baixa (6m/min) (**Figura 7**).

Figura 7. Treinamento dos ratos em esteira ergométrica.

4.2.4 Avaliação funcional da força do músculo esquelético – teste de deambulação

Os animais foram submetidos ao teste de deambulação padronizado por Kennel et al (1996). Nesse teste, as patas dos animais foram colocadas em contato com tinta preta não tóxica e, em seguida, eles foram posicionados em uma caixa retangular de madeira (45 cm de comprimento, 8 cm de largura e 20 cm de altura; sem teto e forrada com papel branco) para caminharem por três tentativas. A cada tentativa, o papel branco foi trocado para registrar as passadas do teste (**Figura 8**). Posteriormente, o comprimento das passadas foi medido e foi computada a média das três tentativas. Também foi medido o tamanho do rato (comprimento naso-anal) e foi feita uma relação entre a média do comprimento da passada e o tamanho do rato, gerando um índice de deambulação [116].

Figura 8. Teste de deambulação. **(A)** Patas dos animais em contato com a tinta fresca; **(B)** posicionados em caixa de madeira retangular forrada com papel branco; **(C)** caminhada sobre o papel branco deixando a marca das passadas.

4.2.5 Indução da sepse por ligação e punção cecal (CLP)

Os animais dos grupos CLP e CLPT foram submetidos à laparotomia seguida de ligação e punção cecal (CLP) como descrito por Wichterman et al (1980) [117] e Ritter et al (2003) [15] e Buras et.al (2005) [5]. Nesta técnica, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 80 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina. Sob condições assépticas, foi realizada incisão longitudinal na linha média do abdome, expondo o ceco para fora da cavidade peritoneal. A ligação foi realizada na base do colon direito, de forma a isolar o ceco e não interromper o fluxo intestinal. Entre a ligação e a porção distal do ceco, foi feita uma punção, atravessando somente um lado do ceco, com uma agulha 14-gauge. Após a perfuração fez-se uma leve pressão permitindo que fosse extravasado fluído fecal, sendo em seguida recolocado o ceco na cavidade peritoneal **(Figura 9)**. Após a sutura da parede abdominal e injeção subcutânea de solução salina (5 ml por 100g de peso corporal), os animais foram levados novamente a suas gaiolas e receberam antibiótico terapia durante 24 horas (clindamicina 25mg/kg de 8 em 8 horas e ceftriaxona 30mg/kg de 12 em 12 horas). Os animais dos grupos Sham e ShamT foram submetidos aos mesmos procedimentos, com exceção de que não foi realizada a ligação e a punção cecal. Para minimizar a possibilidade dos animais não desenvolverem sepse, os procedimentos cirúrgicos foram realizados sempre pela mesma pessoa, treinada previamente de acordo com a padronização descrita e validada por Ritter et al 2003 e 2004 [15, 118]. Adicionalmente, todos os animais foram observados após a indução da sepse por CLP, registrando-se sinais de

infecção como pêlo arrepiado, letargia, taquipnéia, perda de massa corporal e o número de animais sobreviventes após 48 horas. A taxa de sobrevivência prevista pelo modelo é de aproximadamente 60%.

Figura 9. Técnica de ligação e punção cecal (CLP). A ligação foi realizada na base do colon direito (a), de forma a isolar o ceco e não interromper o fluxo intestinal (b). Entre a ligação e a porção distal do ceco, foi realizada uma punção, atravessando somente um lado do ceco, com uma agulha 14-gauge (c). Adaptado de Buras 2005 [5].

4.2.6 *Sacrifício dos animais, coleta de sangue e de tecidos*

Após dois dias da cirurgia, todos os animais foram anestesiados com 80 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina, momento em que foram submetidos à incisão longitudinal na linha média do abdome, as vísceras foram afastadas e o sangue foi coletado diretamente na aorta decendente. Em seguida os animais foram sacrificados, conforme normas do COBEA, permitindo assim a retirada dos tecidos a serem analisados.

Os músculos sóleo e plantar (pata direita e esquerda), e o músculo diafragma, foram coletados, pesados e devidamente armazenados no freezer -80 °C, para as futuras análises. O músculo tibial anterior da pata esquerda foi removido para registrar a massa muscular úmida e seca (após 24 horas a 60 °C) (**Figura 10**). A tíbia da pata direita foi removida e dissecada para ser um parâmetro de correção da massa muscular.

Figura 10. Coleta dos músculos esqueléticos estudados. **(A)** Remoção da loja posterior dos músculos. **(B)** Retirada do músculo sóleo. **(C)** Retirada do músculo plantar. **(D)** Músculo diafragma. **(E)** Retirada do músculo tibial anterior. **(F)** Medida da massa dos músculos.

Para a realização da técnica da reação histoquímica muscular, fragmentos de cada músculo do sóleo e plantar foram fixados através do gel *tissue freezing medium* em um fragmento de cortiça, para manter o tecido na posição correta pré-congelamento. Posteriormente à fixação na cortiça, o fragmento muscular foi mergulhado em isopentano, crioprotetor que evita

artefato nas amostras, em seguida congelado em nitrogênio líquido, onde foram mantidos até o momento da realização dos cortes em cristato.

4.3 Parâmetros analisados

4.3.1 Análise bioquímica do lactato e leucócitos sanguíneos

4.3.1.1 Lactato sanguíneo: após a coleta, o plasma foi armazenado em eppendorf com fluoreto. A determinação quantitativa do lactato foi realizada no equipamento ADVIA 1800 (ADVIA[®] Chemistry Systems, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Australia) através de um ensaio enzimático. Resumidamente, a concentração do analito é obtida através da reação da oxidação do lactato em piruvato e peróxido de hidrogênio e a formação de um corante que pode ser medido com o espectrofotômetro. Primeiramente o lactato é oxidado pelo lactato oxidase em piruvato e peróxido de hidrogênio; sua quantificação é realizada através da formação de corante pelo peróxido de hidrogênio e um cromogênio na presença de oxidase; a alteração correspondente de absorbância á 545/694 nm é proporcional a concentração de lactato no plasma. Os valores de concentração de lactato obtidos são expressos em mMol/L.

4.3.1.2 Leucócitos sanguíneo: após a coleta, o plasma foi armazenado em eppendorf com EDTA. A determinação dos leucócitos foi realizada no aparelho *Cell-Dyn* 3500 (Abbot Diagnostics), que utiliza tanto a dispersão de laser quanto a tecnologia de impedância para contagem e medição das células. A utilização de duas tecnologias para a contagem dos leucócitos

serve como um mecanismo interno de controle de qualidade. O aparelho fornece histogramas da distribuição por volume celular e gráfico de dispersão das populações de leucócitos. Inicialmente, as células são separadas em granulócitos e células mononucleares, com base na lobularidade e na complexidade. Depois, os granulócitos são separados em eosinófilos e neutrófilos, baseando-se na capacidade única dos leucócitos em despolarizarem a luz. Em seguida, as células mononucleares são separadas em monócitos, linfócitos e basófilos degranulados, com base no tamanho e na complexidade celulares. Por fim, são indicadas as cinco populações em uma plotagem da lobularidade contra o tamanho. A quantidade de leucócitos obtida é expressa em cél/mm^3 .

4.3.2 Análise morfológica da musculatura esquelética

4.3.2.1 Caracterização histoquímica do músculo esquelético

Parte dos músculos sóleo e plantar foi congelada em isopentano resfriado em nitrogênio líquido, para avaliação histológica da estrutura da musculatura esquelética. Tais músculos foram usados devido à distinção na distribuição dos tipos de fibras musculares, uma vez que o músculo sóleo apresenta características predominantemente oxidativas, ao passo que o músculo plantar demonstra predomínio de fibras glicolíticas. Os músculos foram posteriormente cortados em criostato em secções transversais de 10 μm de espessura obtidos através de um criostato (LEICA CM1100), a -24°C coletados em lâminas.

A avaliação da área de secção transversa e dos tipos de fibras musculares foi realizada por meio da reação para miosina ATPase (BROOKE e KAISER, 1970). As fibras do tipo I (lentas e oxidativas) reagem fortemente na solução ácida (pH 4,3), podendo ser identificadas em aquisições microscópicas como as fibras mais escuras, enquanto as fibras do tipo II (rápidas e glicolíticas) podem ser identificadas como sendo as mais claras. O inverso ocorre na solução básica (pH 10,3) (**Figura 11**).

Figura 11. Caracterização histoquímica do músculo esquelético. Músculos sóleo (**A**) e plantar (**C**) no pH 4,3 com diferenciação das fibras tipo I (escuras), tipo II (mais claras). O oposto é caracterizado no pH 10,3 nos músculos sóleo (**B**) e plantar (**D**).

Para reação em pH 4,3, os cortes não fixados, foram incubados em tampão acetato (44 ml de CH_3COONa 0,2 M, 50 ml de 1,2% CH_3COOH , 200 ml de água destilada e 530 mg de CaCl_2 , pH 4,3) durante 10 min.

Para a reação em pH 10,3, os cortes foram fixados a 4 °C em formol cálcio de Backer (50 ml de CH_2O 10% e 0,5 g de CaCl_2), posteriormente foram lavados com água destilada e pré-incubados por 10 min em tampão glicina (0,75 g de $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$, 0,59 g de NaCl , 0,8 g de CaCl_2 , 100 ml de água destilada e 90 ml de NaOH 0,1 M, pH 10,3).

Após a incubação dos cortes em diferentes soluções a metodologia seguiu de forma idêntica para as duas reações, como segue: Os cortes, após a incubação, foram lavados em água destilada e, posteriormente, incubados em solução contendo 60 ml de tampão glicina e 100 mg de ATP-Na_2 , pH 9,5 por 35 min a 37 °C; em seguida, foram enxaguados com água destilada e mantidos em cloreto de cobalto 2% por cinco minutos para depois serem mantidos em solução 0,5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por três minutos, sendo finalmente enxaguados com água destilada e montados com gelatina-glicerina.

4.3.2.2 Determinação da área de secção transversa e tipo de fibras musculares

A captura das imagens foi realizada com magnificação de 200x e objetiva de 20x. A aquisição das imagens foi processada em computador acoplado a um sistema de vídeo por um programa de imagens (Leica Qwin).

Para a contagem do número de fibras e para a avaliação da área de secção transversa das fibras foi utilizado o sistema de análise de imagens (*Imagem Pró Plus 4.0 Media Cybernetics*).

Para a análise da tipificação das fibras foi feita fotomontagem de cinco campos aleatórios, com objetiva de 20x, de um corte por lâmina em pH 4,3 e 10,3 para determinar o número e a porcentagem de cada um dos tipos de fibra.

Para a identificação dos subtipos de fibras, em cortes seriados processados em diferentes pHs, 4,3 e 10,3, foi realizada a comparação entre as colorações obtidas nesses ensaios segundo as observações de [119].

Para a medida da área de secção transversa, foram utilizadas as mesmas lâminas da análise histoquímica, onde foram avaliados no mínimo cinco campos aleatórios na objetiva de 20x. A área de cada fibra muscular foi mensurada e a média calculada.

4.3.3 Análise metabólica energética: enzimas do ciclo de Krebs, cadeia de transporte de elétrons (CTE) e creatinaquinase (CK)

Os músculos esqueléticos foram homogeneizados (1:10 *p/v*) em tampão SETH, pH 7,4 (sacarose 250 mM, EDTA 2 mM, Trizma base 10 mM, heparina 50 IU/mL). O homogeneizado foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante armazenado a -80°C.

As proteínas do homogenato de músculo foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951), e albumina sérica bovina foi utilizada como padrão [120].

4.3.3.1 Enzimas do ciclo de Krebs

Enzima citrato sintase: A atividade da enzima citrato sintase foi avaliada em um meio de incubação contendo ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,1 mM, ácido oxaloacético 0,2 mM, Triton X-100 0,1 % e acetil-CoA 0,1 mM, em um tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. A redução do DTNB a ácido tionitrobenzóico (TNB) foi medida espectrofotometricamente a 412 nm por 3 minutos a 37°C [121]. A atividade é expressa em nmol (min.mg de proteína)⁻¹.

Enzima succinato desidrogenase: Para a medida da atividade da enzima succinato desidrogenase, ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 62,5 mM pH 7,4, Triton X-100 0,1 %, succinato de sódio 1 mM e dicloroindofenol (DCIP) 9 µM, foi adicionada amostra contendo cerca de 80 a 140 µg de proteína. Os sistemas foram pré-incubados por 30 minutos a 30°C em banho-maria e, após, foi adicionado azida sódica 4,3 mM, rotenona 7 µM, metassulfato de fenazina 1 mM e DCIP 42 µM. A redução do DCIP é determinada em 600 nm durante 5 minutos a 25°C [122]. A atividade é expressa em nmol (min.mg de proteína)⁻¹.

Enzima malato desidrogenase: A atividade NADH-específica da malato desidrogenase é avaliada espectrofotometricamente conforme o método descrito por Tretter e Adam-Vizi (2000). A reação é iniciada após a adição de oxaloacetato e o consumo de NADH é acompanhado através da redução da

absorbância em 340 nm durante 3 a 5 minutos a 37°C [123]. A atividade é expressa em nmol (min.mg de proteína)⁻¹.

4.3.3.2 Enzimas da CTE

Atividade do complexo I: A atividade da NADH desidrogenase foi avaliada pelo método descrito por Cassina e Radi (1996) pela taxa de NADH-dependente da redução de ferricianeto a 420 nm [124]. Os resultados são expressos em nmol (min.mg de proteína)⁻¹.

Atividade do complexo II (succinato: DCIP oxirredutase): O meio de incubação foi constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), succinato de sódio (16 mM) e DCIP (8 µM). Inicialmente pré-incubou-se com 40-80 µg de proteínas do homogeneizado a 30°C por 20 minutos. Depois, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7 µM de rotenona e a reação iniciou com adição de 40 µM de DCIP. As absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 600 nm. A atividade do complexo II foi medida pela diminuição da absorbância causada pela redução do 2,6-dicloroindofenol [122]. Os resultados são expressos em nmol (min.mg de proteína)⁻¹.

Atividade do complexo II-III: (succinato: citocromo c oxirredutase): O meio de reação, constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), contendo succinato de sódio (16 mM), foi pré-incubado com 40-80 µg de proteínas do homogeneizado a 30°C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionados 4 mM de azida sódica e 7 µM de rotenona e a reação foi iniciada pela adição de 0,6 µg/mL de citocromo c e as absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 550 nm. A atividade do complexo II+CoQ+III foi

medida pelo aumento da absorbância causado pela redução do citocromo *c* [122]. Os resultados são expressos em nmol (min.mg de proteína)⁻¹.

Atividade do complexo IV: (citocromo *c* oxidase): O meio de incubação foi o tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0), dodecil-maltisídeo (0,6 mM) e 10-20 µg de proteínas (homogeneizado). A reação foi iniciada com a adição de 0,7 µg de citocromo *c* reduzido. A atividade do complexo IV foi medida a 25°C por 10 minutos. A atividade da citocromo *c* oxidase foi medida pelo decréscimo na absorbância devido à oxidação de citocromo *c* previamente reduzido. As leituras foram feitas a 550 nm [125]. Os resultados são expressos em nmol (min.mg de proteína)⁻¹.

4.3.3.3 Enzima CK: Após um período de 15 minutos de pré-incubação, a reação foi iniciada com a adição de ADP a uma concentração final de 3,2 mM em 100 µL de meio contendo 7,08 mM de fosfocreatina e de 0,8 a 1 µg de proteínas (homogeneizado). Após um período de 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida com 20 µL de ácido p-hidroximercuribenzóico (pHMB) 50 mM e a coloração rósea foi obtida pela adição de 100 µL de α-naftol 20%, 680 µL de água MilliQ e 100 µL de diacetil 20%. A leitura foi feita por espectrofotometria a 540 nm segundo o método de Hughes (1962). Os resultados são expressos em nmol (min.mg de proteína)⁻¹.

4.3.4 Análise do estresse oxidativo e das enzimas do sistema antioxidante

Para as análises das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e para a catalase (CAT) os músculos esqueléticos foram homogeneizados (1:10 *p/v*) em tampão fosfato; para a superóxido dismutase (SOD), os músculos foram homogeneizados em tampão glicina e para carbonil em tampão carbonil. O homogeneizado foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante armazenado a -80°C.

As proteínas do homogenato de músculo foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951), e albumina sérica bovina foi utilizada como padrão [120].

4.3.4.1 Medida de TBARS: como índice de peroxidação lipídica foi medido a atividade de TBARS no homogenato de músculo durante uma reação ácida aquecida como previamente descrito [126]. Brevemente, as amostras obtidas foram misturadas com 1ml de ácido tricloroacético 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico, fervidas por 15 minutos e após a quantidade de TBARS foi determinada pela absorbância em 535 nm.

4.3.4.2 Medida do dano oxidativo em proteínas: o dano oxidativo das proteínas musculares foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme previamente descrito [127]. Brevemente, as amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina. Os grupamentos carbonil foram medidos pela absorbância em 370nm.

4.3.4.3 Atividade da SOD e da CAT: a atividade das enzimas antioxidantes foi aferida conforme previamente descrito. A atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio em 240 nm [128]. A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente [129].

4.3.5 Análise do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (SUP)

4.3.5.1 Análise da atividade do complexo proteassomal 26S: os músculos esqueléticos foram homogeneizados em tampão de lise (pH 7,4), contendo mannitol 210 mM, sucrose 70mM, MOPS 5mM, EDTA 1mM. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5ml e a concentração de proteína das amostras analisada por meio do método de Bradford (Bio-Rad - EUA). Alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C até o momento de serem utilizadas. O ensaio de atividade do complexo proteassomal 26S é baseado na clivagem de um peptídeo (sequência: Leu-Leu-Val-Tyr [LLVY]), substrato do sítio catalítico quimiotripsina. O peptídeo é comercializado conjugado à sonda fluorescente 7-Amino-4-Methylcoumarina (AMC), e quando clivado pelo complexo proteassomal emite fluorescência. Portanto, o ensaio foi realizado na presença de Tris (25mM), MgCl₂ (200mM), ATP (1μM) e o substrato (2,5μM) (pH 7,5, 200μL volume final). Utilizou-se 25μg de proteínas citosólicas para o músculo sóleo e para o plantar e diafragma foi utilizado 50 μg. A fluorescência da amostra foi acompanhada a 37°C, sendo 350nm e 440nm as frequências de excitação e emissão,

respectivamente. O ensaio foi realizado na presença e na ausência do inibidor específico do proteassoma, epoxomicina (1 μ M), e a diferença entre as duas taxas de emissão de fluorescência foi atribuída ao complexo proteassomal 26S presente na amostra.

4.3.5.2 Expressão gênica das E3 ligases Atrogin-1/MAFbx e MuRF-1: foi avaliada a expressão dos genes das E3 ligases Atrogin-1/MAFbx e MuRF-1 nos músculos esqueléticos. Para isso foi realizado o isolamento do RNA total utilizando Trizol (Invitrogen, SP, Brasil). As concentrações de RNA foram determinadas por medida de absorbância de 260 nm. A pureza do RNA foi determinada pelo cálculo da razão das absorbâncias de 260nm e 280nm (espectrofotometria por NanoDrop 2000, *Thermo Scientific, Rockford, IL, USA*) e por gel de agarose 1% marcado com Nancy-520 (Sigma-aldrich, SP, Brasil). O RNA isolado foi armazenado a -80°C até sua utilização para a reação em cadeia da polimerase (PCR para a confecção de cDNA). Para a transcrição reversa (cDNA) foi utilizado *RevertaidTM First Strand cDNA synthesis kit* (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA), onde 2 μ g de RNA total foram adicionados numa reação contendo oligo dT (0.5 μ g), *RiboLockTM RNase inhibitor* (20u), 1 mM de dNTP mix, *RevertAidTM Reverse Transcriptase* (200u), totalizando uma solução final de 20 μ L (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA), a qual foi incubada a 42°C por 1h mais 10 min a 70°C para término da transcrição reversa. A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real utilizando *primers* específicos (Tabela 1) e *Maxima[®] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA). A análise do PCR em tempo real foi realizada utilizando os seguintes

parâmetros de ciclos: 50°C por 2min, 95°C por 10min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15s cada ciclo e 60°C por 1min. A quantificação da fluorescência e análise da amplificação das bandas foi feita pelo Sistema de Detecção de Sequências ABI Prism 7500 (*Applied Biosystems*). Os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclos (Ct) como descrito pelo produtor do sistema. Os valores de delta Ct (DCt) foram calculados para cada amostra e para cada gene de interesse como o Ct do gene de interesse menos o Ct do gene normalizador, no caso, a ciclofilina. O cálculo das mudanças relativas no nível de expressão do gene de interesse (DDCt) foi realizado por subtração do DCt do grupo Sham para o correspondente DCt dos outros grupos (ShamT, CLP e CLPT). Os resultados foram representados em unidade arbitrária (*fold*).

Quadro 1 – Primers utilizados para avaliação da expressão gênica em qRT-PCR.

Genes	Forward	Reverse
Ciclofilina	5'-TGGCAAGCATGTGGTCTTTGGGAAG-3'	5'-GGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGCCATTC-3'
Atrogin-1	5'-TACTAAGGAGCGCCATGGATAC-3'	5'-GTTGAATCTTCTGGAATCCAGG-3'
MURF-1	5'-GGCGGGAGGGTTGGGTCTCACTC-3'	5'-CCCCAATACCCAGCCCCTTCTGC-3'

4.4 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos das variáveis estudadas foram digitados em planilhas distintas e armazenados na forma de arquivos do programa Microsoft Office Excel e expressos como média±erro padrão da média (EPM). Todos os dados apresentaram distribuição normal após serem submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov.

As análises para comparar os efeitos do treinamento entre os dois grupos experimentais (Não-Treinados e Treinados) dos dados pré-cirúrgicos do teste de esforço máximo e do teste de deambulação foram realizadas através do teste *t* de *Student* para amostras independentes.

Todas as análises para comparar os efeitos do treinamento e da cirurgia entre os quatro grupos experimentais (Sham, ShamT, CLP e CLPT) foram realizadas através da análise de variância de fator duplo (ANOVA-*two-way*) com *post-hoc* de Duncan. A variável de desempenho analisada foi o índice de deambulação. As variáveis morfológicas analisadas foram: massa corporal total; massa dos músculos tibial anterior, diafragma, sóleo e plantar; AST dos músculos sóleo e plantar. As variáveis metabólicas analisadas foram às enzimas do ciclo de Krebs, da CTE e da CK dos músculos diafragma, sóleo e plantar. As variáveis do estresse oxidativo analisadas foram à formação de TBARS e carbonil, e as enzimas antioxidantes analisadas foram SOD e CAT, nos músculos diafragma, sóleo e plantar. As variáveis da expressão gênica analisadas foram as E3 ligases Atrogin-1 e MURF-1 e a variável da atividade do complexo proteassomal 26S, nos músculos diafragma, sóleo e plantar.

Para o tratamento estatístico dos dados utilizou-se o programa estatístico: *Statistica software, StatSoft, Tulsa, OK*. O valor de $p < 0,05$ foi considerado indicador de diferenças estatisticamente significativas. Para a confecção dos gráficos utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5*.

5. RESULTADOS

5.1 Medidas de desempenho físico

A **Figura 12-A e 12-B** apresenta os resultados do treinamento sobre o desempenho físico, onde se observa aumento significativo ($p<0,05$) nos metros percorridos e no índice de deambulação dos ratos do grupo Treinado, respectivamente. Portanto, o treinamento foi eficaz na melhora do desempenho físico inerente à capacidade de tolerância ao esforço físico e à força muscular.

Figura 12. Capacidade de tolerância ao esforço físico representada pela máxima distância percorrida no teste de esforço máximo **(A)**; e, força dos músculos esqueléticos representada pelo índice de deambulação medido no teste de deambulação **(B)**, de ratos wistar dos grupos Não-Treinado e Treinado no momento pré-cirúrgico. Os testes foram realizados após oito semanas de protocolo de treinamento em esteira ergométrica. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram analisados através do teste t de *Student*. *, $p<0.05$ vs Não-Treinado.

Após 48 horas da realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais dos quatro grupos foram submetidos a novo teste de deambulação. Na **Figura 13** observa-se que o grupo CLP apresentou índices de

deambulação significativamente inferiores quando comparado com os demais grupos e o grupo CLPT conseguiu manter índices semelhantes aos grupos Shams.

Figura 13. Força dos músculos esqueléticos representada pelo índice de deambulação medido no teste de deambulação de ratos wistar dos grupos Sham, ShamT, CLP e CLPT após 48 horas dos procedimentos cirúrgicos. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT.

5.2 Medidas sanguíneas

A **Figura 14-A** e **14-B** apresenta os resultados das análises da concentração de lactato e leucócitos sanguíneos após 48 horas de cirurgia, respectivamente. Os grupos CLP e CLPT apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) na quantidade de leucócitos quando comparados com os grupos Sham e ShamT. Considerando a concentração de lactato, os dois grupos CLPs apresentaram aumentos quando comparados com os grupos Shams, porém observa-se que o grupo CLP apresentou aumentos próximos

a significância estatística, com $p=0,06$ comparado ao grupo ShamT e $p=0,07$ comparado ao grupo Sham.

Figura 14. Concentração de lactato sanguíneo **(A)** e leucócitos **(B)** após 48 horas dos procedimentos cirúrgicos. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham; #, $p<0.05$ vs. CLP; §, $p<0.05$ vs. ShamT.

5.3 Medidas morfológicas

5.3.1 Massa corporal total

Após a realização dos procedimentos cirúrgicos, foram realizadas medidas diárias de massa corporal total. A **Figura 15** mostra que houve uma perda de massa corporal após 48 horas de aproximadamente 25g dos grupos CLPs e dos grupos Shams em torno de 12 g. Quando a perda de massa foi comparada entre os grupos através da análise de variância de dois fatores houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos CLPs e os Shams.

Figura 15. Diferença da massa corporal entre o momento pré-cirúrgico e após 48 horas da cirurgia. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; §, $p < 0.05$ vs. ShamT.

5.3.2 Massa úmida e razão massa úmida e seca do músculo tibial anterior

Na **Figura 16-A** observa-se a massa úmida do músculo tibial anterior corrigido pelo comprimento da tíbia e na **Figura 16-B** razão entre a massa úmida e seca desse músculo. Os resultados indicam que o grupo CLP apresentou valores significativamente menores que todos os outros grupos. Por outro lado, o grupo CLPT não foi diferente dos grupos Sham e ShamT. A massa úmida do tibial anterior, do grupo CLP, foi 17,2% menor do que a do grupo Sham (**Figura 16-A**) e a massa seca foi 11% menor do que o grupo Sham (**Figura 16-B**).

Figura 16. Massa do músculo tibial anterior corrigida pelo comprimento da tíbia **(A)** e razão massa úmida/seca do músculo tibial anterior **(B)** após 48h da cirurgia. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT.

5.3.3 Massa dos músculos diafragma, sóleo e plantar

Observa-se na **Figura 17**, a massa muscular corrigida pela tíbia, onde os três músculos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, porém em todos os músculos o grupo CLP apresentou valores menores; tanto o músculo diafragma como o músculo sóleo apresentaram diminuição de 6,8% na massa muscular comparado ao grupo Sham (**Figura 17-A e 17-B**); o músculo plantar apresentou uma diferença de menos 9,5% da massa, comparativamente ao grupo Sham (**Figura 17-C**). Já o grupo CLPT, apresentou aumento de 6,8% na massa do músculo diafragma e 0,5% na massa do sóleo comparado ao grupo Sham; já o músculo plantar, apresentou diminuição de 5% na massa comparado ao grupo Sham.

Figura 17. Massa dos músculos esqueléticos diafragma **(A)**, sóleo **(B)** e plantar **(C)** corrigidos pelo comprimento da tíbia, após 48h da cirurgia. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan.

5.3.4 Área de secção transversa (AST) do músculo sóleo

Observa-se na **Figura 18** a AST das fibras do músculo sóleo. O grupo CLP apresentou valores estatisticamente menores, quando comparado com o grupo Sham, na AST do total das fibras e nas fibras do tipo I; já o grupo CLPT não apresentou diferenças com o grupo Sham (**Figura 18-A e 18-B**). Os grupos experimentais não apresentaram diferenças estatísticas entre o tamanho da AST das fibras do tipo II (**Figura 18-C**).

Figura 18. Área de secção transversa (AST) das fibras do músculo sóleo. **(A)** AST do total das fibras; **(B)** AST das fibras tipo I; e **(C)** AST das fibras tipo II após 48h da cirurgia. Os grupos foram formados por um número amostral de 4 ratos em cada grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham.

5.3.5 Área de secção transversa (AST) do músculo plantar

Observa-se na **Figura 19** a AST das fibras do músculo plantar. O grupo CLP apresentou uma tendência tênue a valores menores comparativamente ao grupo Sham, na AST do total das fibras, nas fibras do tipo I e do tipo II; já no grupo CLPT observa-se valores semelhantes ao grupo Sham (**Figura 19-A, 19-B e 19-C**).

Figura 19 Área de secção transversa (AST) das fibras do músculo plantar. **(A)** AST do total das fibras; **(B)** AST das fibras tipo I; e **(C)** AST das fibras tipo II após 48h da cirurgia. Os grupos foram formados por um número amostral de 4 ratos em cada grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan.

5.4 Medidas metabólicas energéticas

5.4.1 Enzimas do ciclo de Krebs e CTE

5.4.1.1 Diafragma

Os resultados da atividade das enzimas do ciclo de Krebs do músculo diafragma são apresentados na **Figura 20**. Observa-se que o grupo CLP apresentou tendência de diminuição na atividade das três enzimas. Os grupos ShamT e CLPT apresentaram tendência de aumento na atividade das mesmas enzimas (**Figura 20-A, 20-B e 20-C**), sendo que na

enzima SDH do grupo CLPT houve aumento estatisticamente significativo comparado ao grupo ShamT e CLP (**Figura 20-A**).

Na **Figura 21** são apresentadas as enzimas da CTE. No grupo CLP a atividade das enzimas do complexo I e II-III está significativamente diminuída quando comparada a todos os outros grupos experimentais. Já o grupo CLPT manteve os valores semelhantes ao grupo Sham.

Figura 20. Enzimas do Ciclo de Krebs do músculo diafragma. **(A)** SDH – succinato desidrogenase; **(B)** MDH – malato desidrogenase; **(C)** CS – citrato sintase. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT.

Figura 21. Enzimas da Cadeia de Transporte de Elétrons (CTE) do músculo diafragma. **(A)** Complexo I; **(B)** Complexo II; **(C)** Complexo II-III; **(D)** Complexo IV. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT.

5.4.1.2 Sóleo

Os resultados da atividade das enzimas do ciclo de Krebs do músculo sóleo são apresentados na **Figura 22**. Observa-se que os grupos Sham e CLP apresentaram valores menores na atividade das três enzimas comparativamente aos grupos ShamT e CLPT, sendo que no grupo CLP as diferenças foram significativas estatisticamente nas enzimas MDH e CS quando comparadas aos dois grupos treinados; já na SDH, foi estatisticamente diferente somente comparado ao grupo CLPT.

Na **Figura 23** observam-se as enzimas da CTE do músculo sóleo. No grupo CLP houve diminuição significativa na atividade da enzima do complexo I comparativamente ao grupo Sham e ShamT. O grupo CLPT manteve os valores semelhantes em todos os complexos ao grupo Sham.

Figura 22. Enzimas do Ciclo de Krebs do músculo sóleo. **(A)** SDH – succinato desidrogenase; **(B)** MDH – malato desidrogenase; **(C)** CS – citrato sintase. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT.

Figura 23. Enzimas da Cadeia de Transporte de Elétrons (CTE) do músculo sóleo. **(A)** Complexo I; **(B)** Complexo II; **(C)** Complexo II-III; **(D)** Complexo IV. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT.

5.4.1.3 Plantar

Os resultados da atividade das enzimas do ciclo de Krebs do músculo plantar são apresentados na **Figura 24**. Observa-se que o grupo CLP apresentou diminuição da atividade da enzima SDH e foi estatisticamente diferente de todos os grupos experimentais (**Figura 24-A**). A enzima MDH foi estatisticamente menor somente comparada ao grupo ShamT (**Figura 24-B**) e a enzima CS foi menor do que o ShamT mas com

um $p=0,067$ (**Figura 24-C**). O grupo CLPT apresentou a atividade das três enzimas semelhante aos grupos Sham e ShamT.

Na **Figura 25** observam-se as enzimas da CTE do músculo plantar. No grupo CLP houve diminuição significativa na atividade da enzima do complexo II-III comparativamente ao grupo ShamT e quando comparado ao grupo Sham o valor de p foi de 0,064; já nos complexos I, II e IV observou-se uma tendência a diminuição da atividade comparativamente aos grupos experimentais.

Figura 24. Enzimas do Ciclo de Krebs do músculo plantar. **(A)** SDH – succinato desidrogenase; **(B)** MDH – malato desidrogenase; **(C)** CS – citrato sintase. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham; #, $p<0.05$ vs. CLP; §, $p<0.05$ vs. ShamT.

Figura 25. Enzimas da Cadeia de Transporte de Elétons (CTE) do músculo plantar. **(A)** Complexo I; **(B)** Complexo II; **(C)** Complexo II-III; **(D)** Complexo IV. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham.

5.4.2 Enzima CK

Na **Figura 26** observa-se a atividade enzimática creatina quinase (CK) dos músculos diafragma, sóleo e plantar. O grupo CLP apresentou atividade significativamente aumentada nos músculos sóleo e plantar quando comparado ao grupo Sham (**Figura 26-B e 26-C**). No músculo

diafragma também existe atividade enzimática aumentada comparativamente ao grupo Sham, porém o teste estatístico deu um $p=0,07$. (**Figura 26-A**). O grupo CLPT, apresentou valores semelhantes ao grupo Sham da atividade de CK em todos os músculos estudados (**Figura 26-A, 26-B e 26-C**).

Figura 26. Enzima creatina quinase (CK) analisada nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham; #, $p<0.05$ vs. CLP; §, $p<0.05$ vs. ShamT.

5.5 Medidas do estresse oxidativo

5.5.1 TBARS

Na **Figura 27** são apresentados os resultados da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos músculos diafragma, sóleo e plantar. O grupo CLP apresentou valores significativamente maiores nos três músculos estudados quando comparado a todos os grupos experimentais e o grupo CLPT manteve os valores similares aos grupos Shams (**Figura 27-A, 27-B e 27-C**).

Figura 27. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) analisadas nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT.

5.5.2 Carbonil

Na **Figura 28** observam-se os resultados da formação de carbonil nos músculos diafragma, sóleo e plantar. O grupo CLP apresentou valores significativamente maiores nos três músculos estudados quando comparado ao grupo Sham e o grupo CLPT manteve os valores similares aos grupos Shams (**Figura 28-A, 28-B e 28-C**).

Figura 28. Carbonil analisado nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT.

5.6 Medidas das enzimas do sistema antioxidante

5.6.1 SOD

Na **Figura 29** são apresentados os resultados da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) nos músculos diafragma, sóleo e plantar. A atividade da SOD nos músculos diafragma e plantar foi semelhante em todos os grupos experimentais (**Figura 29-A e 29-C**). Já no músculo sóleo, os grupos treinados apresentaram valores de SOD significativamente maiores do que os grupos não treinados (**Figura 29-B**).

Figura 29. SOD analisado nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; #, $p < 0.05$ vs. CLP; §, $p < 0.05$ vs. ShamT.

5.6.2 CAT

Na **Figura 30** são apresentados os resultados da atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) nos músculos diafragma, sóleo e plantar. A atividade da CAT nos músculos diafragma, sóleo e plantar foi semelhante em todos os grupos experimentais. No músculo plantar percebe-se uma tendência dos grupos treinados apresentarem valores mais altos do que os grupos não treinados (**Figura 30-C**).

Figura 30. CAT analisado nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os grupos foram formados por um número amostral de 7 ratos em cada grupo Sham e 9 ratos em cada grupo CLP. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan.

5.7 Medidas do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (SUP)

5.7.1 Medida da atividade do 26S-Proteassoma

Na **Figura 31** observam-se os resultados da atividade máxima do complexo proteolítico proteassomal 26S nos músculos diafragma, sóleo e plantar. O grupo CLP apresentou valores significativamente maiores nos três músculos estudados quando comparado ao grupo Sham; o grupo CLPT apresentou o mesmo comportamento, com excessão do músculo sóleo que manteve a atividade semelhante aos dois grupos Sham.

Figura 31. Atividade máxima do 26S-Proteassoma analisada nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; §, $p < 0.05$ vs. ShamT.

5.7.2 Medida da expressão gênica da E3 ligase Atrogin-1/MAFbx

Na **Figura 32** é apresentada a expressão gênica da E3 ligase Atrogin-1/MAFbx nos músculos diafragma, sóleo e plantar. No diafragma, o grupo ShamT apresentou expressão aumentada comparada aos grupos CLP e CLPT ($p<0,05$) e ao grupo Sham ($p=0,07$) (**Figura 32-A**). No sóleo, somente o grupo CLPT apresentou expressão diminuída comparada ao grupo Sham ($p<0,05$) (**Figura 32-B**). Já no plantar, o grupo CLP mostrou expressão aumentada comparada ao ShamT e CLPT ($p<0,05$), e também ao grupo Sham com $p=0,08$ (**Figura 32-C**).

Figura 32. Expressão gênica da E3 ligase Atrogin-1/MAFbx analisada nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p<0.05$ vs. Sham; #, $p<0.05$ vs. CLP; §, $p<0.05$ vs. ShamT.

5.7.3 Medida da expressão gênica da E3 ligase MuRF-1

Na **Figura 33** observa-se a expressão gênica da E3 ligase MuRF-1 nos músculos diafragma, sóleo e plantar. Somente o diafragma apresentou expressões com diferenças estatísticas entre os grupos; o grupo ShamT mostrou uma expressão gênica maior do todos os grupos experimentais ($p < 0,05$) e o grupo CLP apresentou uma expressão gênica maior que o Sham com um $p = 0,55$ (**Figura 33-A**).

Figura 33. Expressão gênica da E3 ligase MuRF1 analisada nos músculos **(A)** diafragma, **(B)** sóleo, e **(C)** plantar. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan. *, $p < 0.05$ vs. Sham; §, $p < 0.05$ vs. ShamT.

Quadro 2 – Resumo dos principais resultados obtidos no estudo.

Principais Resultados	CLP Não Treinado vs Sham	CLP Treinado vs Sham
Força dos músculos esqueléticos	↓	↔
Lactato sanguíneo	↑§	↑*
Leucócitos sanguíneo	↑	↑
<i>Medidas morfológicas</i>		
Massa corporal	↓	↓
Razão massa úmida: massa seca músculo esquelético	↓	↔
Massa dos músculos esqueléticos	↓*	↔
AST das fibras musculares sóleo	↓	↔
AST das fibras musculares plantar	↓*	↔
<i>Medidas metabólicas energéticas</i>		
Enzima do ciclo Krebs diafragma (SDH)	↓*	↑§
Enzimas da CTE diafragma (complexo I e II-III)	↓	↔
Enzimas do ciclo Krebs sóleo (SDH, MDH, CS)	↔	↑§
Enzimas da CTE sóleo (complexo I)	↓	↔
Enzimas do ciclo de Krebs plantar (SDH)	↓	↔
Enzimas da CTE plantar (complexo II-III)	↓§	↔
Enzima CK diafragma	↑§	↔
Enzima CK sóleo	↑	↔
Enzima CK plantar	↑	↓
<i>Medidas do estresse oxidativo</i>		
TBARS diafragma	↑	↔
TBARS sóleo	↑	↔
TBARS plantar	↑	↔
Carbonil diafragma	↑	↔
Carbonil sóleo	↑	↔
Carbonil plantar	↑	↔

Principais Resultados	CLP Não Treinado vs Sham	CLP Treinado vs Sham
<i>Medidas enzimas antioxidantes</i>		
SOD diafragma	↔	↔
SOD sóleo	↔	↑
SOD plantar	↔	↔
CAT diafragma	↔	↔
CAT sóleo	↔	↔
CAT plantar	↔	↑*
<i>Medidas do SUP</i>		
Atividade 26S-proteassoma diafragma	↑	↑
Atividade 26S-proteassoma sóleo	↑	↔
Atividade 26S-proteassoma plantar	↑	↑
Expressão gênica Atrogin-1 diafragma	↔	↔
Expressão gênica Atrogin-1 sóleo	↔	↓
Expressão gênica Atrogin-1 plantar	↑§	↔
Expressão gênica MuRF-1 diafragma	↑§	↔
Expressão gênica MuRF-1 sóleo	↔	↔
Expressão gênica MuRF-1 plantar	↔	↔

↔, sem alteração; ↑, aumento; ↓, diminuição; * tendência tênue estatística; § tendência forte estatística.

6. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que o treinamento físico aeróbico antes da indução da sepse esteve associado à manutenção da força muscular, à prevenção da perda de massa muscular, a melhora e manutenção do metabolismo oxidativo, a prevenção do estresse oxidativo e a manutenção de algumas variáveis do SUP.

As medidas pré-cirúrgicas de desempenho físico, representadas pela capacidade de tolerância ao esforço físico e força dos músculos esqueléticos, após 8 semanas de protocolo de TF de predominância aeróbica foram significativamente melhores no grupo Treinado. Com apenas seis semanas de treinamento aeróbico é possível observar aumento de 50 a 100% do conteúdo mitocondrial da fibra o que propicia uma melhora na capacidade de consumo de oxigênio por grama de tecido [4]. Mesmo após 48 horas dos procedimentos cirúrgicos, o grupo treinado induzido a sepse (CLPT) conseguiu manter a força dos músculos esqueléticos, testada através do teste de deambulação. Já o grupo não treinado induzido a sepse (CLP), apresentou índice de força muscular significativamente menor quando comparado com todos os grupos experimentais.

Pacientes sépticos apresentam grande perda de massa corporal, relacionada a fatores de risco como grande ativação dos mediadores inflamatórios e catabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas musculares [1, 58]. Nesse estudo, comprovou-se essa grande perda de massa corporal após 48 horas nos grupos CLP e CLPT. Porém, quando se mediu a massa dos diferentes tipos de músculos esqueléticos, os grupos CLP e CLPT

apresentaram resultados diferentes entre eles. A massa do músculo tibial anterior do grupo CLP foi estatisticamente menor do que todos os outros grupos. Nesse mesmo músculo foi feita uma relação entre a massa úmida e a massa seca (após 24 horas de desidratação em forno a 60 graus C) com o intuito de detectar edema (bastante comum em paciente séptico) e a quantidade de proteínas musculares, encontrou-se a mesma relação de diminuição no grupo CLP. Importante salientar que o tibial anterior, é um músculo esquelético grande e participa ativamente da corrida no movimento de dorsiflexão do tornozelo. Já o sóleo, é um músculo pequeno (aproximadamente $\frac{1}{4}$ da massa do tibial anterior), com predominância de fibras tipo I (oxidativas), participante do movimento de flexão plantar do tornozelo. Nesse músculo, o grupo CLP não apresentou diminuição estatisticamente significativa. Para avaliar os efeitos da sepse no músculo esquelético com predominância de fibras do tipo II (glicolítico), se utilizou o músculo plantar. Esse músculo tem tamanho médio comparado ao tibial e ao sóleo e possui, aproximadamente, metade da massa do tibial anterior. Também se observou tendência de diminuição da massa do plantar do grupo CLP. Uma das possíveis explicações para que os músculos sóleo e plantar não tenham apresentado diminuição significativa da massa muscular, como aconteceu com o tibial anterior, seria porque são músculos que têm massa bem menor comparativamente ao tibial. Hipotetiza-se que com mais 24 horas essas diminuições seriam estatisticamente significativas. Muitos estudos que avaliaram músculo esquelético na sepse, observaram diferenças no processo de atrofia entre os músculos com predominância

oxidativa e glicolíticas; as fibras mais suscetíveis são as tipo II (glicolíticas)[17, 75, 130] Também existem estudos que avaliam diferenças entre o músculo diafragma e músculos esqueléticos periféricos durante a sepse [33, 131]. Portanto, nesse estudo, também se avaliou o diafragma, que é um músculo esquelético com predominância oxidativa, e o grupo CLP apresentou uma tendência a diminuição da massa.

Embora a avaliação da massa do músculo seja um parâmetro direto do conteúdo de massa muscular, sua aplicação em músculos cuja massa é muito pequena pode se tornar uma limitação. Assim, para se ter uma avaliação mais precisa da massa muscular dos músculos com predominância oxidativa e glicolítica utilizou-se a técnica da miosina ATPase que permite diferenciar tipos de fibras musculares e com isso poder fazer a avaliação da AST dos tipos de fibras. Dessa forma, foi possível realizar uma análise mais sensível do trofismo muscular dos músculos sóleo e plantar.

Através da diferenciação dos tipos de fibras e das medidas da AST das fibras musculares dos músculos sóleo e plantar, foi possível constatar que as fibras oxidativas do músculo sóleo do grupo CLP sofreram redução significativa. O grupo CLPT conseguiu manter a AST dessas fibras. O músculo plantar apresentou perfil similar, porém não foi estatisticamente significativo. Considerando atrofia dos tipos de fibras musculares esperava-se observar no grupo CLP atrofia mais proeminente das fibras glicolíticas, já que vários estudos demonstraram que o tipo de fibra mais sensível a alteração no trofismo nessas situações patológicas é o tipo II [75, 132-134]. Porém, na sepse também é preciso considerar a apatia e falta de movimento

como uma variável interveniente no processo de atrofia, o que afeta diretamente músculos posturais como o sóleo.

A manifestação da miopatia esquelética na sepse, em medidas macroscópicas como a de massa muscular e de função muscular, acontece após várias manifestações em nível molecular como descrito nas Figuras 1, 2 e 3 da revisão de literatura [1, 2]. São acionadas várias cascatas de sinalizações celulares para mudanças de perfis bioquímicos e de expressão de proteínas que no decorrer do tempo resultarão em atrofia e disfunção muscular, comumente encontrada em pacientes sépticos internados em UTIs [1, 19, 21, 24, 30, 135, 136].

Está bem descrito na literatura que a disfunção mitocondrial tem implicações na DMO [94] e que ela acontece independentemente da estabilização da oxigenação tecidual [137]. No contexto da sepse, a disfunção mitocondrial foi demonstrada no fígado [94], em estruturas cerebrais [138], no coração [139] e no músculo esquelético [33, 140]. Em desenho experimental similar a esse estudo, porém sem treinamento físico, Peruchi et al (2011) avaliaram se a sepse induzida por CLP poderia modificar a atividade mitocondrial avaliada através das enzimas da CTE comparando o diafragma com o quadríceps. Após 48 horas de CLP, somente no músculo diafragma houve diminuição significativa dos quatro complexos da CTE, o que levou os autores a concluir que parecia ser secundário ao estresse oxidativo precoce e correlacionado com a diminuição da força contrátil do músculo [33]. Em nosso desenho experimental, utilizou-se a mesma padronização da técnica de indução de sepse [15] o mesmo

tempo de 48 hs, o músculo diafragma, porém com avaliação dos músculos sóleo e plantar, além do grupo treinado previamente para a realização das comparações. Como nosso objetivo foi estudar os efeitos do treinamento sobre a miopatia esquelética foram avaliados vários músculos esqueléticos que representam diferentes localizações e predominâncias de tipos de fibras musculares; (1) o diafragma, com predominância oxidativa (central); (2) o sóleo, com predominância oxidativa (periférico); e (3) o tibial anterior e o plantar, com predominância glicolítica (periférico). Isso é particularmente importante devido às adaptações musculares serem dependentes das características dos tipos de músculos, além do tipo de treinamento [99, 103]. No nosso estudo, além das enzimas da CTE foram avaliadas três enzimas do ciclo de Krebs. No músculo diafragma, não se observou diminuição significativa das enzimas do ciclo de Krebs no grupo não treinado induzido a sepse (CLP). Porém, nas enzimas da CTE nossos resultados corroboram com os achados de Peruchi et al (2011), que mostraram diminuição significativa nos complexos da CTE do músculo diafragma [33]. Já o grupo treinado induzido a sepse (CLPT) manteve a atividade das enzimas da CTE do diafragma nos limites de normalidade; e ainda, a enzima SDH desse mesmo grupo apresentou valores bem elevados ($p=0,056$) quando comparado com o controle (Sham). Já o músculo plantar, similar ao quadríceps na predominância de fibras tipo II (glicolítico), não apresentou resultados similares aos de Peruchi et al (2011), que mostraram aumento na atividade das enzimas dos complexos da CTE no grupo induzido a sepse. Nossos resultados relacionados ao músculo plantar do grupo CLP, indicaram

tendência de diminuição na atividade dos complexos da CTE, sendo mais proeminente no complexo II-III com $p=0,064$, e ainda, diminuição significativa da enzima SDH, comparado ao grupo Sham. O músculo sóleo, com predominância de fibras tipo I (oxidativo), avaliado nessa situação de sepse, apresentou diminuição estatisticamente significativa na atividade do complexo I. Os músculos sóleo e plantar foram escolhidos para esse estudo devido a suas características histoquímicas diferentes e por participarem efetivamente dos movimentos de flexão plantar do tornozelo e flexão do joelho, utilizados na corrida, já que para que o músculo sofra as adaptações é necessário que seja exposto a sobrecarga mecânica (atividade contrátil) [4]. Assim, o músculo esquelético é um tecido extremamente maleável capaz de consideráveis adaptações metabólicas e morfológicas em resposta a cargas repetidas de atividade contrátil [102]. As adaptações do músculo induzidas pela atividade contrátil são muito específicas, profundamente dependentes do tipo de exercício, da frequência semanal, da intensidade e duração da sessão de exercício [99]. O protocolo de exercícios utilizado nesse estudo foi o de predominância aeróbica [115], caracterizado por ser de intensidade moderada e de longa duração. Um dos efeitos do exercício moderado regular é grande aumento da capacidade de resistência aeróbica [44], possibilitando aumentar significativamente o número e a função das mitocôndrias musculares [101]. Muitos estudos têm demonstrado os mecanismos de adaptação do exercício moderado como melhora no metabolismo, diminuição do estresse oxidativo e aumento das enzimas do sistema antioxidante, reduzindo a produção basal de ERO e diminuindo a

fuga de radicais livres durante a fosforilação oxidativa [36, 141, 142]. Na discussão sobre a função mitocondrial que está diretamente relacionada ao metabolismo aeróbico, nossos resultados corroboram com a afirmação de que o treinamento melhora e/ou mantém o metabolismo aeróbico dos músculos diafragma mesmo após a indução da sepse, conseguindo preservar a função mitocondrial. Nos músculos plantar e sóleo onde não foi observada uma disfunção tão pronunciada no grupo CLP, observou-se a tendência de atividades enzimáticas mitocondriais mais elevadas no grupo induzido a sepse previamente treinado (CLPT). De qualquer maneira, nessas funções nossos resultados também corroboram com o estudo de Peruchi et al 2011, confirmando que o diafragma parece mais suscetível a desarranjos mitocondriais do que os músculos periféricos [33].

Como compensação metabólica, pode haver aumento da enzima creatinaquinase do sistema dos fosfatos de alta energia, que tem papel central no metabolismo de tecidos que consomem grande quantidade de energia, como o muscular [143]. Também a elevação da creatinaquinase pode ser indicador de lesão muscular [144]. Nossos resultados indicaram exacerbação significativa da atividade da enzima creatinaquinase nos músculos sóleo, plantar e diafragma, sugerindo que houve compensação metabólica e possíveis microlesões musculares.

Outro aspecto a ser considerado na miopatia esquelética é o estresse oxidativo que tem particular importância na evolução da sepse e é avaliado através da oxidação de proteínas e lipídios [28]. Nossos resultados indicam que a sepse aumentou a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas nos

músculos esqueléticos diafragma, sóleo e plantar do grupo não treinado (CLP) e que o exercício conseguiu prevenir essa exacerbação. Peruchi et al (2011) também analisaram o estresse oxidativo em lipídios, após 48 horas de sepse, e encontraram peroxidação lipídica significativamente aumentada no músculo diafragma. No quadríceps, no entanto, somente tendência de aumento [33]. Em estudo de Ritter et al (2003), a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas após 48 horas de sepse, em ratos não sobreviventes, encontravam-se estatisticamente aumentadas no diafragma, coração, pulmão, fígado e rim [15]. Em estudo subsequente, utilizando desenho experimental semelhante, Ritter et al (2004) testaram o efeito da utilização dos antioxidantes N-acetilcisteína e deferoxamina no estresse oxidativo de lipídios dos mesmos órgãos testados anteriormente e fazendo relação com a sobrevivência dos animais. As medidas realizadas no experimento foram após 12 horas de indução de sepse por CLP, e os níveis de peroxidação lipídica dos órgãos também estavam significativamente aumentados e o tratamento com os antioxidantes conseguiu minimizar esses efeitos e aumentar a sobrevivência dos animais [118].

O treinamento físico aeróbico protege as células contra o estresse oxidativo devido à melhora na eficiência metabólica e no aumento das enzimas do sistema de defesa antioxidante [34, 35]. Em situações de produção excessiva de ERO, onde as defesas antioxidantes estão comprometidas, há efeito deletério nos tecidos, como por exemplo, no músculo esquelético, estimulando a degradação proteica [145]. Assim, parece ser bastante pertinente utilizar estratégias que maximizem as

defesas antioxidantes do organismo, como por exemplo, o exercício físico. Programas de treinamento de predominância aeróbica têm sido amplamente utilizados como um “antioxidante” em várias situações como câncer e insuficiência cardíaca [97, 142]. Por exemplo, Linke et al (2005) estudaram o efeito de seis meses de treinamento, a 70% do $\text{VO}_{2\text{máx}}$, em sessões diárias de 20 minutos em bicicleta ergométrica, mais uma sessão semanal de 60 minutos de caminhada e calistenia, em 12 pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (ICC) sobre parâmetros de estresse oxidativo, no músculo vasto lateral; através das medidas das enzimas antioxidantes, de peroxidação lipídica e detecção de apoptose celular, concluíram que o exercício físico exerceu efeitos antioxidantes no músculo esquelético dos pacientes com ICC principalmente devido a um aumento da atividade das enzimas removedoras de radicais livres [97]. Nosso estudo é o primeiro a utilizar o TF aeróbico prévio à indução da sepse em modelo experimental, avaliando o efeito antioxidante, como possível estratégia para minimizar a miopatia esquelética. O (s) mecanismo (s) para explicar essa proteção contra o prejuízo muscular na sepse provavelmente está ligado ao exercício físico melhorar o metabolismo aeróbico e as defesas antioxidantes através do aumento da atividade das enzimas que podem proteger o músculo contra a ação do estresse oxidativo. Na remoção de ERO, a primeira linha de defesa contra o radical superóxido é a enzima SOD [35] que catalisa a reação em peróxido de hidrogênio e a enzima CAT, outra enzima antioxidante, que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio em água. O TF aeróbico tem efeito *upregulate* nas enzimas antioxidantes SOD, CAT e

glutathiona peroxidase (GP_x) no músculo esquelético [36, 146-149] e essas enzimas podem proteger o músculo esquelético contra os danos provocados por ERO [34, 35]. Nossos resultados demonstraram que o treinamento físico conseguiu prevenir os danos ocasionados pelo estresse oxidativo nos lipídios e proteínas do músculo esquelético, o que pode ter sido modulado pela melhora da eficiência metabólica e/ou do sistema antioxidante. Considerando os três músculos estudados, somente o sóleo apresentou aumento significativo da enzima SOD e os músculos diafragma e plantar apresentaram uma tendência tênue de aumento comparado ao grupo CLP sedentário. Analisando em conjunto os dados do metabolismo aeróbico e das enzimas antioxidantes, parece que o efeito protetor do exercício sobre o estresse oxidativo do músculo esquelético está mais relacionado a melhora da eficiência do metabolismo, já que o grupo treinado não sofreu diminuição de nenhuma enzima do ciclo de Krebs e CTE; e ainda, manteve e/ou diminuiu os níveis de CK.

Estudos em diferentes modelos experimentais de sespe têm mostrado a ativação do SUP no músculo esquelético, através da expressão aumentada das ligases MuRF-1 e Atrogin-1 [17, 75, 150] e da atividade do proteassoma [73, 134]. Nossos resultados mostraram atividade do proteassoma significativamente aumentada nos músculos diafragma, sóleo e plantar do grupo séptico não treinado. O treinamento físico conseguiu inibir o aumento da atividade do proteassoma somente no músculo sóleo. Nossos achados corroboram com resultados de Klaude et al (2012) que mostraram

não haver diferença no aumento da atividade do proteassoma, de pacientes sépticos, entre os músculos de membros inferiores e respiratórios [59].

Para que as proteínas sejam degradadas pelo proteassoma, as E3 ligases MuRF-1 e Atrogin-1 conjugam a sequência de proteínas a proteína alvo, que então é reconhecida pelo complexo proteassomal 26S, degradando as proteínas em peptídeos de 8-12 aminoácidos como ilustrado na Figura 3 [2, 79]. Analisando nossos resultados de Atrogin-1 e MuRF-1, há uma tendência de aumento da expressão gênica de Atrogin-1 do grupo séptico sedentário somente no músculo plantar ($p=0,08$) e aumento da expressão gênica de MuRF-1 somente no diafragma ($p=0,055$) comparado ao grupo controle. Normalmente na miopatia esquelética as E3 ligases Atrogin-1 e MuRF-1 apresentam aumentos significativos confirmando estados de atrofia [62]. Porém é interessante ressaltar que nos diferentes processos de atrofia nem todos os componentes do SUP estão super expressos [85]. A explicação para esse fato parece estar relacionada à estimulação de diferentes vias de sinalização, que não são ativadas da mesma maneira e ao mesmo tempo, promovendo aumento de determinados componentes do sistema, enquanto outros permanecem inalterados [86]. Estudos têm mostrado que Atrogin-1 está associada aos fatores de transcrição de FOXO [151] e MuRF-1 de NF- κ B. Além dessas E3 ligases estarem associadas à ativação de diferentes vias, existe a hipótese de que elas utilizem diferentes substratos proteicos. [152]. Por exemplo, a degradação da miosina de cadeia leve 1, 2 e a proteína C ligada a miosina está relacionada ao aumento de MuRF-1; já a degradação de filamentos de

actina ocorre com a ação das calpaínas [153] e caspases [76], as quais disponibilizariam as miofibrilas (actina) para a posterior degradação pelo SUP. Nury et al (2007) sugerem ainda a hipótese de haver o *turnover* proteico dos componentes do SUP afetando a expressão destes em determinadas condições atroficas [85].

Outro aspecto a ser considerado é que o presente estudo mostrou resultados de atrofia principalmente no músculo sóleo, bem como de oxidação de lipídios e proteínas em todos os músculos, no grupo séptico não treinado, o que pode sugerir que após 48 horas de indução, nesse modelo, outro sistema de degradação proteica possa estar sendo ativado. Por exemplo, Williams et al (1999) trouxeram evidências de que a sepse está associada ao rompimento das linhas Z do sarcômero nas primeiras oito horas após indução de sepse no músculo sendo ativada pela via proteolítica das calpaínas dependentes de cálcio [130]. Voisin et al (1996) mostraram que além da participação do SUP na degradação proteica da sepse há uma concomitante ativação do sistema lisossomal e cálcio dependente [75].

Considerando o conjunto de dados do presente estudo, a miopatia esquelética desencadeada por esse modelo experimental de sepse apresentou-se associada à diminuição da massa muscular, prejuízos da via metabólica energética aeróbica, aumento do estresse oxidativo e ativação de alguns componentes do SUP em músculos esqueléticos com diferentes características. O protocolo de treinamento utilizado se mostrou adequado para promover a maioria dos efeitos de treinabilidade esperados sobre a musculatura esquelética. Porém, alguns aspectos importantes a considerar

para pesquisas futuras, nesse desenho experimental, seria aumentar o tempo de treinamento e o tempo pós sepse, propiciando efeitos de treinamento mais proeminentes e processo de atrofia mais drástico, respectivamente. Além disso, estudar os mecanismos envolvidos na modulação metabólica e catabólica do músculo esquelético. Considerando sepse, miopatia esquelética e treinamento, seria importante avaliar os efeitos do treinamento no músculo esquelético em modelo experimental pós sepse, bem como avaliar diferentes sistemas de degradação proteica.

7. CONCLUSÕES

Analisados em conjunto, os dados sugerem que o treinamento físico conseguiu atenuar a miopatia esquelética desencadeada por esse modelo experimental de sepse.

Os resultados demonstram que o treinamento físico foi eficaz na melhora do desempenho físico pré e pós indução da sepse pela técnica de CLP.

Os presentes achados indicam que o treinamento físico, antes da sepse, foi capaz de manter o trofismo muscular e o metabolismo energético aeróbico dos músculos diafragma, sóleo e plantar.

O treinamento físico foi efetivo na prevenção da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas nos três músculos estudados. Considerando o sistema antioxidante, os resultados demonstram que o treinamento físico foi eficaz no aumento de uma das enzimas antioxidantes somente no músculo sóleo. Nos componentes do SUP, nesse modelo, os resultados indicam que o treinamento físico foi efetivo na maioria dos parâmetros analisados, porém somente no músculo sóleo. Portanto, conclui-se que o treinamento físico prévio a CLP atenuou os efeitos deletérios da sepse sobre a miopatia esquelética nesse modelo experimental.

Adicionalmente, esse estudo sugere que exercícios aeróbicos regulares podem minimizar prejuízos musculares resultante de graves infecções bacterianas como na sepse.

8. REFERÊNCIAS

- [1] Schefold JC, Bierbrauer J, Weber-Carstens S. Intensive care unit-acquired weakness (ICUAW) and muscle wasting in critically ill patients with severe sepsis and septic shock. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2010 Dec;1(2):147-57.
- [2] Kaiser P, Huang L. Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome biology*. 2005;6(10):233.
- [3] Medeiros A, Bacurau AV, Ferreira JC, Bechara LRG, Brum PC. Adaptações moleculares ao treinamento físico aeróbio na insuficiência cardíaca: músculos cardíaco e esquelético. In: Negrão CE, Barretto ACP, eds. *Cardiologia do Exercício do atleta ao cardiopata*. 3 ed. Barueri: Manole 2010:588-615.
- [4] Hood DA. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2001 Mar;90(3):1137-57.
- [5] Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature reviews*. 2005 Oct;4(10):854-65.
- [6] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*. 2001 Jul;29(7):1303-10.
- [7] Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Critical care medicine*. 1998 Dec;26(12):2078-86.
- [8] Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England journal of medicine*. 2003 Apr 17;348(16):1546-54.
- [9] Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Critical care (London, England)*. 2004 Aug;8(4):R251-60.
- [10] Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics*. 2008;26(5):425-34.

- [11] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992 Jun;101(6):1644-55.
- [12] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive care medicine*. 2003 Apr;29(4):530-8.
- [13] Bednarik J, Vondracek P, Dusek L, Moravcova E, Cundrle I. Risk factors for critical illness polyneuromyopathy. *Journal of neurology*. 2005 Mar;252(3):343-51.
- [14] Eikermann M, Koch G, Gerwig M, Ochterbeck C, Beiderlinden M, Koeppen S, et al. Muscle force and fatigue in patients with sepsis and multiorgan failure. *Intensive care medicine*. 2006 Feb;32(2):251-9.
- [15] Ritter C, Andrades M, Frota Junior ML, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive care medicine*. 2003 Oct;29(10):1782-9.
- [16] Salvemini D, Cuzzocrea S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free radical biology & medicine*. 2002 Nov 1;33(9):1173-85.
- [17] Hasselgren PO, Menconi MJ, Fareed MU, Yang H, Wei W, Evenson A. Novel aspects on the regulation of muscle wasting in sepsis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005 Oct;37(10):2156-68.
- [18] Coakley JH, Nagendran K, Yarwood GD, Honavar M, Hinds CJ. Patterns of neurophysiological abnormality in prolonged critical illness. *Intensive care medicine*. 1998 Aug;24(8):801-7.
- [19] De Jonghe B, Sharshar T, Lefaucheur JP, Authier FJ, Durand-Zaleski I, Boussarsar M, et al. Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study. *Jama*. 2002 Dec 11;288(22):2859-67.
- [20] de Letter MA, Schmitz PI, Visser LH, Verheul FA, Schellens RL, Op de Coul DA, et al. Risk factors for the development of polyneuropathy and myopathy in critically ill patients. *Critical care medicine*. 2001 Dec;29(12):2281-6.

- [21] Garnacho-Montero J, Madrazo-Osuna J, Garcia-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Jimenez-Jimenez FJ, Barrero-Almodovar A, et al. Critical illness polyneuropathy: risk factors and clinical consequences. A cohort study in septic patients. *Intensive care medicine*. 2001 Aug;27(8):1288-96.[22] Spitzer AR, Giancarlo T, Maher L, Awerbuch G, Bowles A. Neuromuscular causes of prolonged ventilator dependency. *Muscle & nerve*. 1992 Jun;15(6):682-6.
- [23] Deem S, Lee CM, Curtis JR. Acquired neuromuscular disorders in the intensive care unit. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003 Oct 1;168(7):735-9.
- [24] Deem S. Intensive-care-unit-acquired muscle weakness. *Respiratory care*. 2006 Sep;51(9):1042-52; discussion 52-3.
- [25] Cankayali I, Dogan YH, Solak I, Demirag K, Eris O, Demircoren S, et al. Neuromuscular deterioration in the early stage of sepsis in rats. *Critical care (London, England)*. 2007;11(1):R1.
- [26] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England journal of medicine*. 2003 Jan 9;348(2):138-50.
- [27] Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. *Intensive care medicine*. 2000 Apr;26(4):474-6.
- [28] Dal-Pizzol F, Ritter C, Cassol-Jr OJ, Rezin GT, Petronilho F, Zugno AI, et al. Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis. *Neurochemical research*. 2010 Jan;35(1):1-12.
- [29] Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Mar;286(3):R491-7.
- [30] Fredriksson K, Hammarqvist F, Strigard K, Hultenby K, Ljungqvist O, Wernerman J, et al. Derangements in mitochondrial metabolism in intercostal and leg muscle of critically ill patients with sepsis-induced multiple organ failure. *American journal of physiology*. 2006 Nov;291(5):E1044-50.
- [31] Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, Samb A, Carreras MC, Boveris A, et al. Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *Faseb J*. 1999 Sep;13(12):1637-46.
- [32] Crouser ED, Julian MW, Blaho DV, Pfeiffer DR. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. *Critical care medicine*. 2002 Feb;30(2):276-84.

- [33] Peruchi BB, Petronilho F, Rojas HA, Constantino L, Mina F, Vuolo F, et al. Skeletal muscle electron transport chain dysfunction after sepsis in rats. *The Journal of surgical research*. 2011 May 15;167(2):e333-8.
- [34] Noble EG, Milne KJ, Melling CW. Heat shock proteins and exercise: a primer. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2008 Oct;33(5):1050-65.
- [35] Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*. 2008 Oct;88(4):1243-76.
- [36] Powers SK, Criswell D, Lawler J, Martin D, Ji LL, Herb RA, et al. Regional training-induced alterations in diaphragmatic oxidative and antioxidant enzymes. *Respiration physiology*. 1994 Feb;95(2):227-37.
- [37] Sen CK. Antioxidants in exercise nutrition. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 2001;31(13):891-908.
- [38] Smuder AJ, Kavazis AN, Min K, Powers SK. Exercise protects against doxorubicin-induced oxidative stress and proteolysis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2011 Apr;110(4):935-42.
- [39] Boveris A, Navarro A. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free radical biology & medicine*. 2008 Jan 15;44(2):224-9.
- [40] Silva LA, Pinho CA, Scarabelot KS, Fraga DB, Volpato AM, Boeck CR, et al. Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. *European journal of applied physiology*. 2009 Apr;105(6):861-7.
- [41] Shefer G, Benayahu D. The effect of exercise on IGF-I on muscle fibers and satellite cells. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2012;4:230-9.
- [42] Coffey VG, Hawley JA. The molecular bases of training adaptation. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 2007;37(9):737-63.
- [43] Negrao CE, Middlekauff HR. Adaptations in autonomic function during exercise training in heart failure. *Heart failure reviews*. 2008 Feb;13(1):51-60.
- [44] Cunha TF, Moreira JB, Paixao NA, Campos JC, Monteiro AW, Bacurau AV, et al. Aerobic exercise training upregulates skeletal muscle calpain and ubiquitin-proteasome systems in healthy mice. *J Appl Physiol*. 2012 Jun;112(11):1839-46.

- [45] Maddocks M, Murton AJ, Wilcock A. Therapeutic exercise in cancer cachexia. *Critical reviews in oncogenesis*. 2012;17(3):285-92.
- [46] Musch TI, Martin LF. The effects of chronic bacteremia on the metabolic response to exercise in the conscious rat. *Circulatory shock*. 1988 Aug;25(4):245-58.
- [47] DeBlieux PM, McDonough KH, Barbee RW, Shepherd RE. Exercise training attenuates the myocardial dysfunction induced by endotoxin. *J Appl Physiol*. 1989 Jun;66(6):2805-10.
- [48] Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *Faseb J*. 2003 May;17(8):884-6.
- [49] Chen HI, Hsieh SY, Yang FL, Hsu YH, Lin CC. Exercise training attenuates septic responses in conscious rats. *Medicine and science in sports and exercise*. 2007 Mar;39(3):435-42.
- [50] de Araujo CC, Silva JD, Samary CD, Guimaraes IH, Marques PD, Oliveira GP, et al. Regular and moderate exercise before experimental sepsis reduces the risk of lung and distal organ injury. *J Appl Physiol*. 2012 Jan 19.
- [51] Gerovasili V, Stefanidis K, Vitzilaios K, Karatzanos E, Politis P, Koroneos A, et al. Electrical muscle stimulation preserves the muscle mass of critically ill patients: a randomized study. *Critical care (London, England)*. 2009;13(5):R161.
- [52] Poulsen JB, Moller K, Jensen CV, Weisdorf S, Kehlet H, Perner A. Effect of transcutaneous electrical muscle stimulation on muscle volume in patients with septic shock. *Critical care medicine*. 2011 2011;39(3):456-61.
- [53] Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama*. 2009 Dec 2;302(21):2323-9.
- [54] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):885-91.
- [55] Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Critical care medicine*. 2001 Jul;29(7 Suppl):S121-5.
- [56] Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science (New York, NY)*. 1999 Jul 9;285(5425):248-51.

- [57] Chiolero R, Revely JP, Tappy L. Energy metabolism in sepsis and injury. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif. 1997 Sep;13(9 Suppl):45S-51S.
- [58] Maitra SR, Wojnar MM, Lang CH. Alterations in tissue glucose uptake during the hyperglycemic and hypoglycemic phases of sepsis. *Shock* (Augusta, Ga. 2000 May;13(5):379-85.
- [59] Klaude M, Mori M, Tjader I, Gustafsson T, Wernerman J, Rooyackers O. Protein metabolism and gene expression in skeletal muscle of critically ill patients with sepsis. *Clin Sci (Lond)*. 2012 Feb;122(3):133-42.
- [60] Callahan LA, Supinski GS. Sepsis-induced myopathy. *Critical care medicine*. 2009 Oct;37(10 Suppl):S354-67.
- [61] Stevens RD, Marshall SA, Cornblath DR, Hoke A, Needham DM, de Jonghe B, et al. A framework for diagnosing and classifying intensive care unit-acquired weakness. *Critical care medicine*. 2009 Oct;37(10 Suppl):S299-308.
- [62] Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J*. 2004 Jan;18(1):39-51.
- [63] Aversa Z, Alamdari N, Hasselgren PO. Molecules modulating gene transcription during muscle wasting in cancer, sepsis, and other critical illness. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2011 Mar-Apr;48(2):71-86.
- [64] Nystrom T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO journal*. 2005 Apr 6;24(7):1311-7.
- [65] Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free radical biology & medicine*. 2002 May 1;32(9):790-6.
- [66] Breusing N, Arndt J, Voss P, Bresgen N, Wiswedel I, Gardemann A, et al. Inverse correlation of protein oxidation and proteasome activity in liver and lung. *Mechanisms of ageing and development*. 2009 Nov-Dec;130(11-12):748-53.
- [67] Powers SK, Kavazis AN, McClung JM. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol*. 2007 Jun;102(6):2389-97.

- [68] 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. *The Journal of physiology*. 1998 Jun 1;509 (Pt 2):565-75.
- [69] Kuwahara H, Horie T, Ishikawa S, Tsuda C, Kawakami S, Noda Y, et al. Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. *Free radical biology & medicine*. 2010 May 1;48(9):1252-62.
- [70] Haidara MA, Ibrahim IM, Al-Tuwaijri AS, Awadalla SA, Yaseen H. Effect of alpha-tocopherol on glucose uptake and contractility in rat skeletal muscle. *Med Sci Monit*. 2003 May;9(5):BR174-7.
- [71] McClung JM, Kavazis AN, Whidden MA, DeRuisseau KC, Falk DJ, Criswell DS, et al. Antioxidant administration attenuates mechanical ventilation-induced rat diaphragm muscle atrophy independent of protein kinase B (PKB Akt) signalling. *The Journal of physiology*. 2007 Nov 15;585(Pt 1):203-15.
- [72] Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *The New England journal of medicine*. 1996 Dec 19;335(25):1897-905.
- [73] Klaude M, Fredriksson K, Tjader I, Hammarqvist F, Ahlman B, Rooyackers O, et al. Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis. *Clin Sci (Lond)*. 2007 Jul;112(9):499-506.
- [74] Ebisui C, Tsujinaka T, Morimoto T, Kan K, Iijima S, Yano M, et al. Interleukin-6 induces proteolysis by activating intracellular proteases (cathepsins B and L, proteasome) in C2C12 myotubes. *Clin Sci (Lond)*. 1995 Oct;89(4):431-9.
- [75] Voisin L, Breuille D, Combaret L, Pouyet C, Taillandier D, Aurousseau E, et al. Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *The Journal of clinical investigation*. 1996 Apr 1;97(7):1610-7.
- [76] Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *The Journal of clinical investigation*. 2004 Jan;113(1):115-23.

- [77] Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism*. 2007 Dec;6(6):472-83.
- [78] Huang J, Forsberg NE. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Oct 13;95(21):12100-5.
- [79] Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews*. 2002 Apr;82(2):373-428.
- [80] Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980 Mar;77(3):1365-8.
- [81] Ciechanover A, Heller H, Katz-Etzion R, Hershko A. Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981 Feb;78(2):761-5.
- [82] Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*. 1998 Feb 6;92(3):367-80.
- [83] Hasselgren PO. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in sepsis-induced muscle catabolism. *Molecular biology reports*. 1999 Apr;26(1-2):71-6.
- [84] Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science (New York, NY)*. 2001 Nov 23;294(5547):1704-8.
- [85] Nury D, Doucet C, Coux O. Roles and potential therapeutic targets of the ubiquitin proteasome system in muscle wasting. *BMC biochemistry*. 2007;8 Suppl 1:S7.
- [86] Li P, Waters RE, Redfern SI, Zhang M, Mao L, Annex BH, et al. Oxidative phenotype protects myofibers from pathological insults induced by chronic heart failure in mice. *The American journal of pathology*. 2007 Feb;170(2):599-608.
- [87] Cooney RN, Kimball SR, Vary TC. Regulation of skeletal muscle protein turnover during sepsis: mechanisms and mediators. *Shock (Augusta, Ga)*. 1997 Jan;7(1):1-16.

- [88] Lang CH, Frost RA, Vary TC. Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. *American journal of physiology*. 2007 Aug;293(2):E453-9.
- [89] Vary TC, Kimball SR. Sepsis-induced changes in protein synthesis: differential effects on fast- and slow-twitch muscles. *The American journal of physiology*. 1992 Jun;262(6 Pt 1):C1513-9.
- [90] Trager K, DeBacker D, Radermacher P. Metabolic alterations in sepsis and vasoactive drug-related metabolic effects. *Current opinion in critical care*. 2003 Aug;9(4):271-8.
- [91] Fredriksson K. FOXO, the spindle in the net for wasting diseases? *The Journal of physiology*. 2008 Nov 15;586(Pt 22):5285.
- [92] Wolfe RR, Burke JF. Glucose and lactate metabolism in experimental septic shock. *The American journal of physiology*. 1978 Nov;235(5):R219-27.
- [93] Frayn KN. Substrate turnover after injury. *British medical bulletin*. 1985 Jul;41(3):232-9.
- [94] Crouser ED. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion*. 2004 Sep;4(5-6):729-41.
- [95] Crespo CJ, Palmieri MR, Perdomo RP, McGee DL, Smit E, Sempos CT, et al. The relationship of physical activity and body weight with all-cause mortality: results from the Puerto Rico Heart Health Program. *Annals of epidemiology*. 2002 Nov;12(8):543-52.
- [96] Oguma Y, Sesso HD, Paffenbarger RS, Jr., Lee IM. Physical activity and all cause mortality in women: a review of the evidence. *British journal of sports medicine*. 2002 Jun;36(3):162-72.
- [97] Linke A, Adams V, Schulze PC, Erbs S, Gielen S, Fiehn E, et al. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation*. 2005 Apr 12;111(14):1763-70.
- [98] Blair SN, Sallis RE, Hutber A, Archer E. Exercise therapy - the public health message. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2012 Aug;22(4):e24-8.
- [99] Adhihetty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubicic V, Hood DA. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Experimental physiology*. 2003 Jan;88(1):99-107.

- [100]Hood DA, Saleem A. Exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007 Jun;17(5):332-7.
- [101]Hood DA. Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2009 Jun;34(3):465-72.
- [102]Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annual review of biochemistry*. 2006;75:19-37.
- [103]Dudley GA, Abraham WM, Terjung RL. Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1982 Oct;53(4):844-50.
- [104]Harms SJ, Hickson RC. Skeletal muscle mitochondria and myoglobin, endurance, and intensity of training. *J Appl Physiol*. 1983 Mar;54(3):798-802.
- [105]Hoppeler H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *International journal of sports medicine*. 1986 Aug;7(4):187-204.
- [106]Davies KJ, Packer L, Brooks GA. Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1981 Jul;209(2):539-54.
- [107]Fitts RH, Booth FW, Winder WW, Holloszy JO. Skeletal muscle respiratory capacity, endurance, and glycogen utilization. *The American journal of physiology*. 1975 Apr;228(4):1029-33.
- [108]Staron RS, Karapondo DL, Kraemer WJ, Fry AC, Gordon SE, Falkel JE, et al. Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. *J Appl Physiol*. 1994 Mar;76(3):1247-55.
- [109]Potthoff MJ, Olson EN, Bassel-Duby R. Skeletal muscle remodeling. *Current opinion in rheumatology*. 2007 Nov;19(6):542-9.
- [110]Radak Z, Chung HY, Goto S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology*. 2005;6(1):71-5.
- [111]Reid MB. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol*. 2001 Feb;90(2):724-31.

- [112] Smith MA, Reid MB. Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2006 Apr 28;151(2-3):229-41.
- [113] Cunha TF, Bacurau AV, Moreira JB, Paixao NA, Campos JC, Ferreira JC, et al. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. *PloS one*. 2012;7(8):e41701.
- [114] Giannesini B, Izquierdo M, Dalmaso C, Le Fur Y, Cozzone PJ, Verleye M, et al. Endotoxemia does not limit energy supply in exercising rat skeletal muscle. *Muscle & nerve*. 2008 Apr;37(4):496-504.
- [115] Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2007 Aug;34(8):760-5.
- [116] Kennel PF, Fonteneau P, Martin E, Schmidt JM, Azzouz M, Borg J, et al. Electromyographical and motor performance studies in the pmn mouse model of neurodegenerative disease. *Neurobiology of disease*. 1996 Apr;3(2):137-47.
- [117] Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *The Journal of surgical research*. 1980 Aug;29(2):189-201.
- [118] Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Critical care medicine*. 2004 Feb;32(2):342-9.
- [119] Hamalainen N, Pette D. The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. *J Histochem Cytochem*. 1993 May;41(5):733-43.
- [120] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951 Nov;193(1):265-75.
- [121] Sreere PA, Brooks GC. The circular dichroism of glucagon solutions. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1969 Feb;129(2):708-10.
- [122] Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1985 Nov 29;153(1):23-36.

- [123]Tretter L, Adam-Vizi V. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci*. 2000 Dec 15;20(24):8972-9.
- [124]Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996 Apr 15;328(2):309-16.
- [125]Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1994 Jul;228(1):35-51.
- [126]Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in enzymology*. 1990;186:421-31.
- [127]Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 1990;186:464-78.
- [128]Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 1984;105:121-6.
- [129]Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods of biochemical analysis*. 1987;32:279-312.
- [130]Williams AB, Decourten-Myers GM, Fischer JE, Luo G, Sun X, Hasselgren PO. Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. *Faseb J*. 1999 Aug;13(11):1435-43.
- [131]Fredriksson K, Rooyackers O. Mitochondrial function in sepsis: respiratory versus leg muscle. *Critical care medicine*. 2007 Sep;35(9 Suppl):S449-53.
- [132]Chai J, Wu Y, Sheng Z. The relationship between skeletal muscle proteolysis and ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in burned rats. *Burns*. 2002 Sep;28(6):527-33.
- [133]Hasselgren PO, James JH, Benson DW, Hall-Angeras M, Angeras U, Hiyama DT, et al. Total and myofibrillar protein breakdown in different types of rat skeletal muscle: effects of sepsis and regulation by insulin. *Metabolism: clinical and experimental*. 1989 Jul;38(7):634-40.
- [134]Minnaard R, Drost MR, Wagenmakers AJ, van Kranenburg GP, Kuipers H, Hesselink MK. Skeletal Muscle wasting and contractile performance in septic rats. *Muscle & nerve*. 2005 Mar;31(3):339-48.

- [135] Larsson L, Li X, Edstrom L, Eriksson LI, Zackrisson H, Argentini C, et al. Acute quadriplegia and loss of muscle myosin in patients treated with nondepolarizing neuromuscular blocking agents and corticosteroids: mechanisms at the cellular and molecular levels. *Critical care medicine*. 2000 Jan;28(1):34-45.
- [136] Hund E. Neurological complications of sepsis: critical illness polyneuropathy and myopathy. *Journal of neurology*. 2001 Nov;248(11):929-34.
- [137] Crouser ED, Julian MW, Dorinsky PM. Ileal VO(2)-O(2) alterations induced by endotoxin correlate with severity of mitochondrial injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999 Oct;160(4):1347-53.
- [138] Comim CM, Rezin GT, Scaini G, Di-Pietro PB, Cardoso MR, Petronilho FC, et al. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Mitochondrion*. 2008 Sep;8(4):313-8.
- [139] Joshi MS, Julian MW, Huff JE, Bauer JA, Xia Y, Crouser ED. Calcineurin regulates myocardial function during acute endotoxemia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006 May 1;173(9):999-1007.
- [140] Protti A, Carre J, Frost MT, Taylor V, Stidwill R, Rudiger A, et al. Succinate recovers mitochondrial oxygen consumption in septic rat skeletal muscle. *Critical care medicine*. 2007 Sep;35(9):2150-5.
- [141] Oh-ishi S, Kizaki T, Ookawara T, Sakurai T, Izawa T, Nagata N, et al. Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997 Nov;156(5):1579-85.
- [142] Pinho CA, Tromm CB, Tavares AM, Silva LA, Silveira PC, Souza CT, et al. Effects of different physical training protocols on ventricular oxidative stress parameters in infarction-induced rats. *Life sciences*. 2012 Feb 16.
- [143] Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *The Biochemical journal*. 1992 Jan 1;281 (Pt 1):21-40.

- [144] Banfi G, Colombini A, Lombardi G, Lubkowska A. Metabolic markers in sports medicine. *Advances in clinical chemistry*. 2012;56:1-54.
- [145] Jackson MJ. Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*. 2005 Dec 29;360(1464):2285-91.
- [146] Jackson MJ. Redox regulation of skeletal muscle. *IUBMB life*. 2008 Aug;60(8):497-501.
- [147] McArdle A, Jackson MJ. Exercise, oxidative stress and ageing. *Journal of anatomy*. 2000 Nov;197 Pt 4:539-41.
- [148] 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.
- [149] Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, et al. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *The American journal of physiology*. 1994 Feb;266(2 Pt 2):R375-80.
- [150] Tiao G, Fagan JM, Samuels N, James JH, Hudson K, Lieberman M, et al. Sepsis stimulates nonlysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation*. 1994 Dec;94(6):2255-64.
- [151] Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, et al. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *Faseb J*. 2005 Mar;19(3):362-70.
- [152] Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, et al. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *The Journal of cell biology*. 2009 Jun 15;185(6):1083-95.
- [153] Tidball JG, Spencer MJ. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. *The Journal of physiology*. 2002 Dec 15;545(Pt 3):819-28.