

Henver Simionato Brunetta

**AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DA p47^{phox} E FENÓTIPO DE
MONÓCITOS APÓS DANO MUSCULAR PROMOVIDO POR
EXERCÍCIO EXCÊNTRICO EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

FLORIANÓPOLIS

2016

Henver Simionato Brunetta

**AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DA p47^{phox} E FENÓTIPO DE
MONÓCITOS APÓS DANO MUSCULAR PROMOVIDO POR
EXERCÍCIO EXCÊNTRICO EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Dissertação submetida ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas, sob orientação do Professor Doutor Everson Araújo Nunes.

FLORIANÓPOLIS

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

BRUNETTA, HENVER

Avaliação do conteúdo da p47phox e fenótipo de monócitos após dano muscular promovido por exercício excêntrico em indivíduos saudáveis / HENVER BRUNETTA ; orientador, Everson Araújo Nunes - Florianópolis, SC, 2016.
121 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Inclui referências

1. Ciências Fisiológicas. 2. Monócitos. 3. Músculo esquelético. 4. Exercício excêntrico. 5. Estresse oxidativo. I. Nunes, Everson Araújo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

"Avaliação do conteúdo da p47^{DNA} e fenótipo de monócitos após dano muscular promovido por exercício excêntrico em indivíduos saudáveis"

Por

Henver Simionato Brunetta

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (02/PPGMCF/2016) do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Fernanda Barboza Lima Christian
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Banca examinadora:



Dr(a) Alex Rafacho (Universidade Federal de Santa Catarina)
Presidente da banca



Dr(a) Mauricio Krause (Universidade Federal do Rio Grande do Sul -
videoconferência)



Dr(a) Adair Roberto Soares Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Alexandra Latini (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2016.

Dedico esse trabalho ao meu avô
Darci Ângelo Brunetta (*in memoriam*)
por me ensinar que as circunstâncias
não importam, mas sim, de que você é
feito.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Everson Araújo Nunes, por ter aberto as portas do seu laboratório e ter me dado essa oportunidade. Pelas conversas, pelos questionamentos, pelos e-mails, artigos, fluorescências e anticorpos, mas principalmente pelo exemplo de humildade, inteligência, integridade e caráter.

À minha mãe, Sandra Regina Brunetta, por absolutamente todo o seu esforço. Por me mostrar que não existe cansaço quando se tem um compromisso, por abrir mão de muitas coisas para me dar o necessário, por não desistir de mim. Também a toda minha família, em especial minha avó Zelcy Maria Brunetta, pela criação e educação recebida. Vocês são os meus maiores incentivos.

À minha namorada, Maísa Trento, pelas horas no ônibus, pelos telefonemas, pelas mensagens, pelo carinho. Acredito que mais importante que chegar ao destino é a pessoa que nos tornamos durante o percurso. Esse caminho foi mais fácil ao seu lado.

Aos meus amigos de Iomerê, Robi, André, Lucas, Biti, Marcelino, Zé e Frizzo, que mesmo longe sempre estavam em meus pensamentos e me lembravam das minhas raízes. Aos amigos de Porto Alegre, Rafa e Ana, que são boas lembranças que guardo do período em que fiquei nessa cidade. Aos meus colegas de apartamento, Leonardo e Leonardo, que viveram todos os momentos dessa pequena história. Aos meus ex-professores da Unoesc, e hoje amigos, Leoberto, Jaisson, Mônica, Neymar, Iti, e todos os que me conheceram desde o início. Aos meus colegas de faculdade, grandes amigos pra vida toda, Elzo, Zebu, Gaúcho, Deividi, e em especial, à minha “quase” irmã Pati.

À Vilma Panza, pela oportunidade de podermos trabalhar juntos, pelos telefonemas, e-mails, artigos e discussões, enfim, por todo o aprendizado que tive ao seu lado. Estendo também ao Professor Doutor Edson da Silva pela oportunidade e pela confiança depositada. Também ao Professor Doutor Fernando Diefenthaler e seus alunos Bruno Moura e Rafael Sakugawa, por toda a execução biomecânica do

projeto, pelas discussões e pela oportunidade. Adicionalmente, agradeço a todos os voluntários que participaram desse estudo, contribuindo com uma pequena peça para a ciência e uma grande fase da minha vida.

A todo o Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas – LIDoC – Amanda, Carolina, Cristiane, Júlia S., Priscila, Thayz, Katia, Júlia R., Paola, e também pelos que estavam quando cheguei e hoje já seguiram seus caminhos. Obrigado pelas conversas, pelas dúvidas, pelos cafés, pela paciência.

Aos funcionários da Universidade Federal de Santa Catarina que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse trabalho. Ao seu Carlos e a dona Vilma, pelos momentos de descontração, fundamentais em dias difíceis. Em especial aos funcionários do Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia – LAMEB – Bibiana, Denis e Vanessa. Por todo o suporte com a aquisição dos dados no citômetro de fluxo.

Ao Professor Doutor Alex Rafacho, pela disponibilidade em auxiliar, sanar dúvidas, discutir problemas e pela confiança depositada. E hoje posso dizer, obrigado pela amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – CAPES – pela bolsa de estudos concedida e à Universidade Federal de Santa Catarina pela estrutura e apoio.

“A única vitória que perdura é a que se conquista sobre a própria ignorância” (Jigoro Kano, criador do judô)

RESUMO

Os monócitos são um grupo de células imunitárias circulantes no sangue, na medula óssea e no baço, constituindo cerca de 10% do total de leucócitos nos humanos. Quando emigram para algum tecido, essas células se diferenciam em macrófagos e tem papel fundamental na homeostase deste devido ao seu alto potencial reparador e angiogênico. Os monócitos têm sido colocados como fundamentais no processo de reparo do músculo esquelético, um tecido com alta capacidade de adaptação frente aos mais diversos estímulos impostos. Duas principais subclasses de monócitos são encontradas na circulação dos seres humanos: as células $CD14^{++}CD16^{-}$, denominadas de monócitos clássicos, com maior predominância, e as células $CD14^{+}CD16^{+}$, em menor proporção. Além das diferenças inerentes ao subtipo de monócitos, tem sido especulado que expressão de proteínas envolvidas na fagocitose, migração e diapedese poderiam estar envolvidas no processo de reparo do músculo esquelético, influenciando a resolução da inflamação causada por algum tipo de estímulo. Diante disso, este estudo teve como objetivo observar o fenótipo e estado de ativação de monócitos circulantes de indivíduos saudáveis expostos a um protocolo de dano muscular induzido por exercício excêntrico. Catorze indivíduos participaram deste estudo, todos do sexo masculino, com idade de $24 \pm 3,6$ anos, massa corporal de $72,3 \pm 10,8$ kg, estatura de $174 \pm 6,1$ cm e % de gordura de $23,8 \pm 2,7$. Foram coletados 16 mL de sangue para análises posteriores, após esse procedimento foi realizado um teste de força isométrica máxima em um dinamômetro isocinético, composto de 3 tentativas com duração de 3-5 segundos e intervalo de 2 minutos, o maior valor obtido em $N \cdot m^{-1}$ foi retido como pico de torque. Após esses procedimentos, foi realizado o protocolo de dano muscular, que consistiu em 3 séries de 20 repetições para flexores do cotovelo, apenas a fase excêntrica, com intervalo de 2 minutos entre as séries, em dinamômetro isocinético a $45^{\circ} \cdot s^{-1}$. As coletas de sangue e de força se seguiram por mais três dias, constituindo 24 horas, 48 horas e 72 horas após o dano. Os dados foram analisados por ANOVA para medidas repetidas e o nível de significância adotado foi 95% ($p < 0,05$). Nos momentos observados após o protocolo de dano, 24h, 48h e 72h, pôde-

se observar um decréscimo significativo na capacidade de produção de torque em comparação ao basal (Basal=69,2±9,9; 24h=50,4±10,7; 48h=53,7±9,3 e 72h=54,5±9,5, em N·m⁻¹). No entanto, a recuperação da funcionalidade muscular não foi uniforme, sendo que um grupo (n=7) teve recuperação esperada 72h após o dano (Basal=100%; 72h=89,7±6,4%), enquanto outro grupo (n=7) teve recuperação inferior a 80% no momento 72h (Basal=100%; 72h=69,5±10,5%). Esses dois grupos foram classificados como Rec >80% (n=7), com idade de 22,7±3,1 anos, massa corporal de 71,4±7 kg, estatura de 173±5,1 cm e % de gordura de 23,7±1,8. O outro grupo foi denominado Rec <80% (n=7), idade 25,3±3,7 anos, massa corporal 73,1±14,1 kg, estatura 174±7,4 cm e % de gordura de 23,8±2,7. Não houve variação no decorrer do tempo para a % de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ em ambos os grupos, contudo, o grupo Rec >80% apresentou valores iniciais significativamente maiores (p<0,05) que o grupo Rec <80% (Basal: Rec <80%=95,9±1,6% vs. Rec >80%=90,2±5,4%). O conteúdo da proteína p47^{phox} foi significativamente maior (p<0,01) no momento 24h em comparação ao basal no grupo Rec >80%. Houve diferença significativa no grupo Rec <80% nos momentos 48h e 72h quando comparados ao momento 24h. Quando analisada a variação em percentual da expressão da p47^{phox} em comparação ao basal, pôde-se observar uma variação negativa da expressão no intervalo basal-24h no grupo Rec <80% em comparação com os outros intervalos (p<0,01), e também uma diferença entre os grupos no intervalo basal-24h (p<0,05). As concentrações de hidroperóxidos lipídicos foram significativamente maiores no momento 48h no grupo Rec >80% (p<0,05). Esses dados sugerem que uma menor proporção de monócitos CD14⁺⁺CD16⁺ juntamente com incremento antecipado na expressão de p47^{phox} possam contribuir para o reparo mais eficiente do músculo esquelético após um dano induzido por exercício excêntrico.

Palavras-chave: Monócito. Reparo tecidual. Músculo esquelético. Exercício excêntrico. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Monocytes are a group of immune cells circulating in the blood, bone marrow and spleen, constituting around 10% of all leukocytes in humans. When they migrate to some tissue are called macrophages and plays a key role in the homeostasis of this due to its high repair capacity and angiogenic potential. Monocytes have been placed as fundamental in the skeletal muscle repair process, a tissue with high capacity of adaptation in front to various stimuli. Two main subclasses of monocytes are found in the circulation of humans: the CD14⁺⁺CD16⁻ cells called monocytes classic, with higher predominance, and the CD14⁺CD16⁺ cells, to a lesser extent. In addition to the inherent differences in a subtype of monocytes, it has been speculated that expression of proteins involved in phagocytosis, migration and diapedesis could be involved in the skeletal muscle repair process, influencing the resolution of inflammation caused by some kind of damage. Thus, this study aimed to observe the phenotype and monocyte activation state of healthy individuals exposed to muscle damage induced by eccentric exercise protocol. Fourteen individuals participated in this study, all male, aged 24±3.6 years, body mass 72.3±10.8 kg, the height of 174±6.1 cm and % fat 23.8±2.7. Initially, 16 mL of blood was collected for further analysis, after this procedure was carried out maximal isometric strength test on an isokinetic dynamometer, consisting of 3 attempts lasting 3-5 seconds with 2 minutes of rest; the highest value obtained in N·m⁻¹ was retained as torque peak. After these procedures, muscle damage protocol was performed which consisted of three sets of 20 repetitions for the elbow flexors, just eccentric actions, with 2 minutes of intervals between series using an isokinetic dynamometer at 45°·s⁻¹. Blood samples and strength followed by three more days, constituting 24 hours, 48 hours and 72 hours after injury. Data were analyzed by ANOVA for repeated measures, and the significance level was 95% (P <0.05). At the moments after the damage protocol, 24h, 48h, and 72h, it was observed a significant decrease in torque production capacity compared to baseline (Baseline=69.2±9.9; 24h=50.4±10.7; 48h=53.7±9.3 and 72h=54.5±9.5). However, the recovery of muscle functionality was not uniform, and one group (n=7)

had expected recovery 72h after damage (Baseline=100%; 72h=89.7±6.4%) while another group (n=7) had less than 80% recovery in time 72h (Baseline=100%; 72h=69.5±10.5%). These two groups were classified as Rec > 80% (n=7), aged 22.7±3.1 years, body mass 71.4±7 kg, height 173±5.1 cm and fat mass 23.7±1.8 %. The other group was designated Rec < 80% (n=7), aged 25.3±3.7 years, body weight 73.1±14.1 kg, height 174±7.4 cm and fat mass 23.8±2.7 %. There was no change over time in the % of monocytes CD14⁺⁺CD16⁻ in both groups, however, the Rec >80% group had values significantly higher at the baseline (p<0.05) than the Rec <80% group (Baseline: Rec <80% = 95,9±1,6% vs. Rec >80% = 90,2±5,4). p47^{phox} expression was significantly higher (p<0.01) when 24 compared to baseline in Rec >80% group. Furthermore, there was a significant increase in the Rec <80% group at the moments 48h and 72h when compared with the moment 24h. When analyzed the variation in the percentage of p47^{phox} expression compared to baseline, it was observed a negative variation of expression in a basal-24 range in Rec <80% group compared with the other intervals (p<0.01), and also a difference between groups at baseline-24 range (p<0.05). For products of oxidative stress, lipid hydroperoxide concentrations were significantly higher at 48 hours in Rec >80% group (p<0.05). These data suggest a lower proportion of CD14⁺CD16⁺ monocytes along with an anticipated increase in p47^{phox} expression may contribute to the more efficient skeletal muscle repair after eccentric exercise muscle damage.

Key-words: Monocyte. Tissue repair. Skeletal muscle. Eccentric exercise. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Geração de monócitos	35
Figura 2.	Emigração de leucócitos da circulação	39
Figura 3.	Macrófagos M1 e M2 e reparo tecidual	42
Figura 4.	NADPH oxidase	44
Figura 5.	p47 ^{phox}	45
Figura 6.	Formação de EROs	47
Figura 7.	Dismutação do ânion radical superóxido	47
Figura 8.	Reação de Fenton e Reação de Haber-Weiss	48
Figura 9.	Teoria dos efeitos das EROS na produção de força.	49
Figura 10.	Interação de cinases e fosfatases com EROs no músculo esquelético	51
Figura 11.	Peroxidação lipídica	53
Figura 12.	Bíceps braquial após exercício excêntrico	57
Figura 13.	Desenho experimental do estudo	64
Figura 14.	Imagem do protocolo de dano muscular	67
Figura 15.	Imagem do ângulo de 90° para CVMI	68
Figura 16.	Redução dos hidroperóxidos lipídicos	70
Figura 17.	Oxidação do Fe ²⁺ por hidroperóxidos lipídicos	71
Figura 18.	Reação de proteínas carboniladas com DNPH	71
Figura 19.	Fluxograma dos participantes do estudo	74
Figura 20.	Capacidade absoluta e % de produção de força	76
Figura 21.	Decaimento na capacidade de produção de força imediatamente após o protocolo de dano	79
Figura 22.	% de células CD14 ⁺ e células duplo-positivas (CD14 ⁺ CD16 ⁺)	85
Figura 23.	Modelo de análise da CD11b	86
Figura 24.	Expressão de CD11b em CD14 ⁺	87
Figura 25.	Modelo de análise da p47 ^{phox}	88
Figura 26.	Expressão da p47 ^{phox} em CD14 ⁺	89
Figura 27.	Proteínas carboniladas e hidroperóxidos lipídicos ..	91
Figura 28.	Resumo dos principais resultados encontrados	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados de caracterização dos sujeitos	75
Tabela 2.	Dados de caracterização dos sujeitos após a estratificação dos grupos em função da força	78
Tabela 3.	Dados de trabalho no exercício excêntrico	79
Tabela 4.	Marcadores bioquímicos de dano celular	81
Tabela 5.	Contagem de células imunitárias	83

SIGLAS E ABREVIATURAS

AGES	Espécies avançadas de glicosilação
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
BaCl ₂	Cloreto de bário
Ca ²⁺	Cálcio
CD	Grupamento de diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>)
CCR-2	Receptor C-C tipo 2
CSF-1	Fator estimulador de colônia 1
CSF-1R	Receptor para fator estimulador de colônia
CPM	Células precursoras miogênicas
CVMI	Contração voluntária máxima isométrica
DAMP	Padrões moleculares associados ao dano
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERK	Cinase regulada por sinais extracelulares
Fe ²⁺	Ferro (estado ferroso)
Fe ³⁺	Ferro (estado férrico)
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
GMP	Progenitor mielóide comum
HSC	Células-tronco hematopoiéticas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
IGF-1	<i>Insulin Growth Factor 1</i>
IPAQ	Questionário internacional de avaliação física
JNK	Cinase N-terminal C-jun
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LOO \cdot	Radical peroxila
L \cdot	Radical lipídico
LPO	Liperoxidação
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos 1
MDC	Quimiocina derivada de macrófagos
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
NK	<i>Natural killers</i>
Nox	NADPH oxidase
NO	Óxido nítrico
O ₂ \cdot^-	Ânion radical superóxido
OH \cdot	Radical hidroxil
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR-1	Receptores de rianodina

SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TBARS	Substância reativa do ácido triobarbitúrico
TGF-1 β	Fator de crescimento transformador 1 β
VEFG	Fator de crescimento vaso endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REFERENCIAL TEÓRICO	32
2.1	O SISTEMA IMUNITÁRIO E O REPARO TECIDUAL	32
2.2	OS MONÓCITOS E O REPARO DO TECIDO MUSCULAR	33
2.2.1	O sistema NADPH oxidase	43
2.2.1.1	p47 ^{phox}	45
2.2.2	Espécies reativas de oxigênio oriundas da Nox	46
2.2.2.1	Peroxidação lipídica	52
2.2.2.2	Carbonilação de proteínas	54
2.3	MODELOS DE DANO AO MÚSCULO ESQUELÉTICO	55
2.3.1	Exercício excêntrico	56
2.3.2	Marcadores indiretos de dano muscular	58
3	JUSTIFICATIVA	60
4	HIPÓTESES	61
5	OBJETIVOS	62
5.1	OBJETIVO GERAL	62
5.1.1	Objetivos específicos	62
6	MATERIAIS E MÉTODOS	63
6.1	Delineamento do estudo e protocolo experimental	63
6.2	SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	64
6.3	AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E NÍVEIS DE ATIVIDADE FÍSICA	65
6.4	PROTOCOLO DE TESTES	66
6.5	TESTE DE FORÇA ISOMÉTRICA	67
6.6	COLETA SANGUÍNEA	68
6.6.1	Contagem de células	69
6.6.2	Expressão de CD14, CD16, CD11b e p47^{phox} em leucócitos	69
6.6.3	Hidroperóxidos lipídicos	70
6.6.4	Carbonilação de proteínas	71
6.6.5	Atividade da creatina cinase total	72
6.6.6	Atividade da aldolase	73
6.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
7	RESULTADOS	74
7.1	CARACTERÍSTICAS DOS SUJEITOS	75

7.2	CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE FORÇA	75
7.3	ESTRATIFICAÇÃO DOS GRUPOS EM FUNÇÃO DA CAPACIDADE DE RECUPERAÇÃO DA FORÇA	77
7.3.1	Dados de caracterização dos sujeitos	77
7.3.2	Trabalho realizado no protocolo de dano	78
7.3.3	Decaimento na capacidade de produção de força imediatamente após o protocolo de dano	79
7.3.4	Marcadores bioquímicos de dano	80
7.3.5	Contagem de leucócitos	82
7.3.6	Fenotipagem de monócitos	84
7.3.7	Produtos do estresse oxidativo	90
8	DISCUSSÃO	92
9	CONCLUSÃO	104
10	PERSPECTIVAS	105
	REFERÊNCIAS	106
	APÊNDICE I	115
	ANEXO I	118
	ANEXO II	121

1 INTRODUÇÃO

Sob condições ideais, o reparo do músculo esquelético ocorre dentro de quatro condições inter-relacionadas e dependentes do tempo, são elas: degeneração, inflamação, regeneração e reparo ou resolução (CAROSIO et al., 2011). Particularmente para esse tecido, a resolução se dá quando sua função está totalmente reestabelecida, ou seja, a capacidade de produzir força. Nesse cenário, os monócitos formam uma classe de células do sistema imunitário que têm sido apontados como um contribuinte nesse processo, conduzindo processos desde a fase da inflamação até o crescimento das células em reparo. (YONA; JUNG, 2010).

Duas principais subclasses de monócitos são encontradas na circulação dos seres humanos: as células $CD14^{++}CD16^{-}$, denominadas de monócitos clássicos e as células $CD14^{+}CD16^{+}$, em menor proporção (ZIEGLER-HEITBROCK, 2015). Nos últimos anos, os monócitos têm recebido substancial atenção como células com alta capacidade angiogênica e potencial reparador (SHANTSILA et al., 2012). Diversos estudos têm observado as flutuações dos monócitos após uma sessão de exercício ou de dano ao músculo esquelético. Os resultados são inconclusivos, podendo ser encontrado monocitose (SHANTSILA et al., 2012), elevação seguida de queda (PAULSEN et al., 2005) ou mesmo nenhuma variação (OKUTSU et al., 2008; SAXTON et al., 2003).

Danos ao tecido muscular resultam em lesão de miofibrilas e início da inflamação, que contribui para remover os debris celulares e para a secreção de citocinas e fatores de crescimento que estimulam a ativação de células satélites (PELOSI et al., 2007). Essas células residem abaixo da lâmina basal e após um estresse nesse tecido são ativadas, iniciando assim o processo de regeneração. Os monócitos/macrófagos contribuem para a proliferação de células satélites, diferenciação em mioblastos, bem como o crescimento dos miotubos. Dessa forma, a importância dos monócitos para a regeneração do tecido muscular tem sido evidenciada por diversos trabalhos,

principalmente em modelo animal (ARNOLD, et al., 2007; MARTINEZ, et al., 2010; LU, et al., 2010).

A fagocitose é o processo pelo qual os monócitos/macrófagos utilizam para remover os debris celulares. O complexo NADPH oxidase (Nox) tem sido apontado como fator determinante para a fagocitose nesse tipo de células (EL-BENNA, et al., 2009). Em recente revisão, Griffiths et al., (2014), sugeriram esse complexo como sendo provavelmente a maior origem do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A Nox tem como única função a produção de espécies reativas de oxigênio e tem sido extensivamente investigado em muitos tipos celulares, especialmente fagócitos (FU, et al., 2014; JIANG; ZHANG; DUSTING, 2011). O complexo Nox desempenha um papel chave na defesa contra patógenos pela geração do ânion superóxido e outras EROs. Concentrações elevadas de EROs podem causar dano nas moléculas em torno do tecido envolvido na reação inflamatória. Uma rigorosa regulação da Nox é necessária para evitar lesões adicionais ao tecido em processo de reparo. Tem sido proposto que a p47^{phox}, uma subunidade que compõe o complexo NADPH oxidase, atua como reguladora da atividade da Nox, migrando do citosol para a membrana plasmática para ativar esse complexo (EL-BENNA et al., 2009).

Arnold et al., (2007) observaram que duas ondas de monócitos migram para o músculo esquelético após dano às miofibrilas. No processo de reparo muscular, a infiltração de monócitos é mediada por diversos componentes envolvidos na marginalização, rolamento e diapedese; a integrina CD11b parece atuar ativamente nesses eventos. A integrina CD11b faz parte de uma família de quatro membros das integrinas $\beta 2$. Ela é expressa na superfície de neutrófilos, monócitos, macrófagos e células NK (*natural killers*) (LUO; CARMAN; SPRINGER, 2007).

O aumento da geração de EROs parece ser uma resposta comum em células expostas ao estresse, assim, é especulado que a regulação redox pode representar um importante sistema de segundo

mensageiro que está envolvido na cascata de sinalização da célula exposta ao estresse (JIANG; ZHANG; DUSTING, 2011). Tem sido proposto que as EROs são necessárias para a capacidade de produção de força no músculo esquelético (REID; KHAWLI; MOODY, 1993). As EROs têm sido apontadas como atuantes na modulação de citocinas, fatores de crescimento, transporte de íons, apoptose, liberação e ação de hormônios, transcrição e neuromodulação, aumento ou diminuição da proliferação celular, indução de morte por apoptose e alteração da função imunitária (DROGE, 2002; JACKSON et al., 2002; LANDER, 1997).

Dentre os diversos tipos de exercícios utilizados para promover dano ao músculo esquelético, destacam-se as ações musculares excêntricas, caracterizadas pela produção de força enquanto o músculo está sendo alongado. Tem sido mostrado que contrações excêntricas resultam em maiores danos morfológicos e funcionais em músculos esqueléticos humanos quando comparado a contrações concêntricas ou isométricas (NEWHAM, et al., 1983; MALM et al., 2004). O prejuízo funcional – por exemplo, redução na capacidade de geração de força – é imediato, prolongado e talvez o mais importante sintoma de dano muscular. A mensuração da função muscular pode prover o mais efetivo meio indireto de avaliação da magnitude e o *time course* do dano resultado das ações musculares excêntricas (PAULSEN, 2012; PROSKE & MORGAN, 2001).

À vista disso, compreender os fenômenos envolvendo a contagem, ativação e fenótipo de monócitos e a produção de EROs, considerando a produção de força após um dano induzido por exercício excêntrico é fundamental para o entendimento dos eventos que transcorrem durante o processo de reparo nesse tipo de tecido para as ciências fisiológicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nessa revisão da bibliografia, serão descritos os eventos relacionados com o dano e o reparo do músculo esquelético frente às condições impostas. As células do sistema imunitário e as suas funções no reparo desse tecido serão abordadas, com maior foco para os monócitos. Estas células têm sido colocadas como determinantes para o reparo muscular e no texto a seguir, a sua gênese, estrutura e função serão descritas em detalhes.

Também será abordada a produção e atuação de espécies reativas de oxigênio nos eventos que sucedem o dano muscular. Os produtos gerados por essas moléculas serão discutidos e qual a sua função em sistemas biológicos. O músculo estriado esquelético será colocado como tecido sujeito às demandas ambientais e a sua função será destacada para obter conhecimento de quão avançado está o processo de reparo.

Dentre esses tópicos, essa revisão busca colocar em pauta o que é de conhecimento da ciência nesse importante processo da fisiologia dos sistemas e também em alguns casos de patologias neuromusculares e/ou imunológicas.

2.1 O SISTEMA IMUNITÁRIO E O REPARO TECIDUAL

Em um organismo saudável, o sistema imunológico inato serve como primeira linha de defesa contra sinais de perigo sejam eles internos ou externos. A sua forma de trabalho é iniciando uma resposta inflamatória protetora que desenvolve durante o tempo através de diferentes fases, da iniciação e ao auge da inflamação, até a resolução e reestabelecimento da integridade do tecido (ITALIANI; BORASCHI, 2014).

O estresse celular é induzido por um rompimento do ambiente local ótimo para a sobrevivência da célula. A célula reage ao estresse de diversas formas, primeiramente através de mecanismos de sinalização intracelulares específicos que tentam diminuir o dano e manter ou

reestabelecer a homeostase, esse fenômeno é conhecido como resposta ao estresse celular (JIANG; ZHANG; DUSTING, 2011). Após a célula ou tecido serem expostas ao estresse, dá-se início a regeneração tecidual. Esta, por sua vez, é um conservado processo evolucionário no qual a interação entre células inflamatórias infiltradas e células residentes deve ser rigidamente coordenada para que a funcionalidade e homeostase do tecido sejam recuperadas (KHARRAZ et al., 2013).

Quando um tecido é exposto à situação de estresse, vários tipos de células do sistema imunitário se envolvem para reestabelecer a homeostase. Primeiramente, há uma grande infiltração de neutrófilos e monócitos, estes com posterior conversão para macrófagos. Esses primeiros eventos têm o objetivo de reestabelecer um ambiente ótimo para a célula, removendo debris celulares e patógenos eventualmente. Há também a participação de células T, basófilos e eosinófilos, no entanto, a participação dessas células é tecido-específica, não podendo ser aplicada em todos os casos. Ainda, o processo de reparo tecidual envolve a produção de eicosanóides, citocinas, quimiocinas, proliferação e diferenciação de células, e é rigorosamente coordenado para que a funcionalidade do tecido seja reestabelecida.

2.2 OS MONÓCITOS E O REPARO DO TECIDO MUSCULAR

Sob condições ideais, o reparo do músculo esquelético ocorre dentro de quatro condições inter-relacionadas e em fase tempo-dependentes, são elas: degeneração, inflamação, regeneração e reparo ou resolução (CAROSIO et al., 2011). Particularmente para o tecido muscular esquelético, a resolução se dá quando sua função está totalmente reestabelecida, ou seja, a capacidade de produzir força. Nesse cenário, os monócitos constituem uma classe de células do sistema imunitário que têm sido apontados como contribuintes em todas as fases, participando de processos desde a inflamação até o crescimento das células em reparo.

Os monócitos caracterizam-se como um grupo de células imunitárias circulantes no sangue, presentes também na medula óssea e

no baço, constituindo cerca de 10% do total de leucócitos nos humanos. As suas características morfológicas são: formato celular irregular, núcleo oval ou no formato de rins, vesículas citoplasmática e alta taxa citoplasma-núcleo. Podem permanecer na circulação em torno de 1 a 3 dias, após esse tempo, se não forem recrutados para um tecido por um sinal de perigo, entram em processo de apoptose e são removidos (YONA; JUNG, 2010).

Os monócitos são importantes elementos da defesa imunológica porque podem fagocitar materiais estranhos, apresentar antígenos para células T e produzir diversas citocinas, incluindo o TNF- α , IL-1 β e IL-6 (do inglês, *tumor growth factor* alfa, interleucina 1 beta e interleucina 6, respectivamente). As células da linhagem monocítica derivam das células tronco mielomonocíticas da medula óssea. Elas maturam para monócitos e, como tais, migram para o fluxo sanguíneo com posterior migração para os tecidos. Os monócitos são originados na medula óssea de células tronco hematopoiéticas (HSCs, do inglês *hematopoietic stem cells*) e se desenvolvem através de uma série de estágios sequenciais de diferenciação: o progenitor mielóide comum (GMP, do inglês *granulocyte-macrophage progenitor*) que é compartilhado com granulócitos, o precursor comum de células dendríticas e macrófagos (MDP, do inglês *macrophage and dendritic cell precursor*) e finalmente o progenitor de monócito cometido (cMoP, do inglês *committed monocyte progenitor*). Como podem ser observados na figura 1, eles migram para a circulação como pró-monócitos e lá, diferenciam-se em monócitos. Essa classe celular tem sido considerada como um reservatório sistêmico de precursores mielóides para renovação dos macrófagos nos tecidos (ITALIANI; BORASCHI, 2014). Nos tecidos, essas células agora diferenciadas em macrófagos, são fenotipicamente e funcionalmente distintas, como os macrófagos alveolares nos pulmões, osteoclastos nos ossos, células de Kupffer no fígado, ou microglia no sistema nervoso central (BELGE et al., 2002).

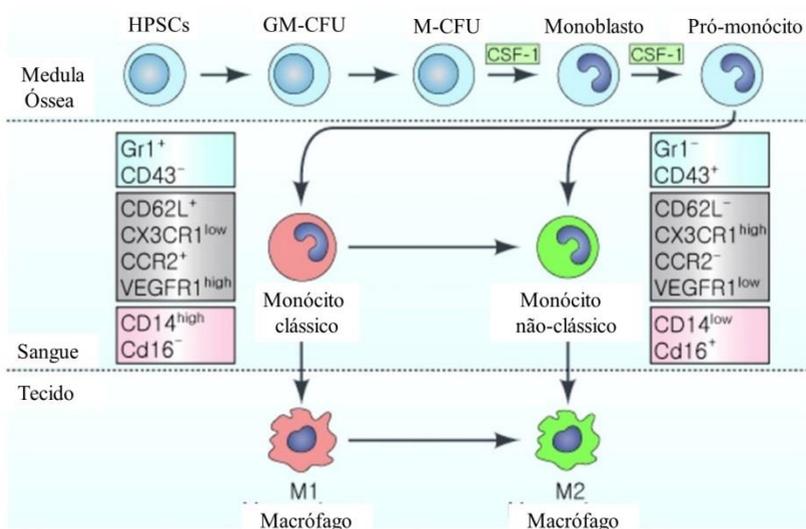


Figura 1 – desenvolvimento dos monócitos na medula óssea e emigração para a circulação. Células-tronco hematopoiéticas (HSC, do inglês *hematopoietic stem cells*) diferenciam-se em monócitos através de múltiplos estágios. Da unidade formadora de colônia de macrófagos/granulócitos (GM-CFU, do inglês *granulocyte-macrophage colony forming unity*) para unidade formadora de colônia de monócitos (M-CFU, do inglês *monocyte colony forming unity*) para monoblastos e então pró-monócitos. Adaptado de Lee et al., (2013).

O controle homeostático do desenvolvimento dos monócitos é exercido principalmente pelo fator estimulador de colônia 1 (CSF-1, do inglês *colony stimulating factor*), também conhecido como M-CSF (do inglês, *monocytes colony stimulating fator*), produzido pelas células estromais. Fagócitos mononucleares maduros por sua vez expressam receptores CSF-1 (CSF-1R, do inglês *colony stimulating fator-1 receptors*) e removem CSF-1 circulantes, permitindo um *feedback* negativo para a proliferação de monócitos. O fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF, do inglês *granulocyte-monocyte colony stimulating fator*) é outro fator envolvido no desenvolvimento de fagócitos mononucleares, mas apenas durante uma situação de inflamação e não sob condições homeostáticas (ITALIANI;

BORASCHI, 2014). Diversas evidências experimentais indicam que monócitos recrutados são efetores inatos da resposta inflamatória para micróbios, matando patógenos via fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*), e citocinas inflamatórias (LU et al., 2011; SERBINA et al., 2008).

Duas principais subclasses de monócitos são encontradas na circulação dos seres humanos: as células CD14⁺⁺CD16⁻, denominadas de monócitos clássicos, com maior predominância e maior expressão de IL-1 β e TNF- α , e as células CD14⁺CD16⁺, em menor proporção e maior expressão de TGF-1 β (do inglês, *transforming growth factor 1 β*) e IL-10 (ZIEGLER-HEITBROCK, 2015). Nos últimos anos, os monócitos têm recebido substancial atenção como células com alta capacidade de síntese e secreção de fatores angiogênicos e potencial reparador (SHANTSILA et al., 2012). A infiltração de monócitos e conversão para macrófagos é necessária para conduzir os benefícios da inflamação e ativar células desse ambiente (linfócitos T, células satélite, mioblastos, células endoteliais e seus progenitores) para suportar a regeneração muscular (PILLON et al., 2013).

Diversos estudos têm observado as flutuações dos monócitos após uma sessão de exercício ou de dano ao músculo esquelético. Os resultados são inconclusivos, podendo ser encontrado monocitose 15 minutos e 1 hora após uma sessão de corrida, quando comparado ao basal (SHANTSILA et al., 2012) ou mesmo nenhuma variação (OKUTSU et al., 2008). Estudos com dano local e menor impacto sistêmico, como exercício resistido utilizando apenas um grupo muscular, também têm resultados contraditórios. Em modelo de dano com exercício excêntrico utilizando quadríceps não foram encontradas diferenças nas concentrações de monócitos pré e pós-dano (SAXTON et al., 2003). Já outro modelo, utilizando o mesmo músculo e o mesmo tipo de contração, pôde-se observar aumento de monócitos após o protocolo com posterior queda, abaixo dos níveis basais (PAULSEN, et al., 2005). Essas diferenças de comportamento podem ser explicadas pela intensidade do protocolo e conseqüentemente, magnitude do dano,

já que o primeiro estudo utilizou 2 séries de 25 repetições, totalizando 50 ações musculares e o segundo estudo utilizou 300 repetições.

Danos ao tecido muscular resultam em lesão de miofibrilas e ativação da inflamação. Isso contribui para a remoção dos debris celulares e também para a secreção de várias citocinas e fatores de crescimento que estimulam a ativação de células satélites (PELOSI et al., 2007). Os monócitos contribuem para a proliferação e diferenciação de mioblastos, bem como o crescimento de miotubos. Destando, dessa forma, a importância dos monócitos para a regeneração do tecido muscular (ARNOLD et al., 2007; MARTINEZ et al., 2010; LU et al., 2010). Os macrófagos residentes no músculo esquelético, derivados de monócitos, são conhecidos por manter a homeostase do tecido e exercem importante função no processo de fagocitose dos debris celulares, indução da inflamação, secreção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento; todos com objetivo de reparar e restabelecer a função muscular após o dano. A regeneração do músculo esquelético em adultos resulta da ativação de células satélites localizadas abaixo da lâmina basal e que são ativadas após um estresse nesse tecido. Depois de ativadas, passam a serem chamadas de células precursoras miogênicas (MPC, do inglês myogenic precursor cells), sofrendo processos de proliferação e fusão, conduzindo ao reestabelecimento da funcionalidade muscular (CHAZAUD et al., 2003).

Quantidades consideráveis de macrófagos residem no músculo, em um compartimento entre o epimísio e o perimísio, chamado de fáscia. Acreditava-se que o processo inflamatório e a regeneração do músculo se davam apenas por ativação destas células. Contudo, quando o recrutamento de monócitos do sangue para o músculo é diminuído, por inibição da integrina CD11b, o processo de reparo não ocorre, indicando assim, a importância desse tipo de célula na regeneração muscular (CHAZAUD et al., 2009). Experimentos conduzidos por Arnold et al., (2007) em camundongos, mostraram que a depleção *in vivo* de monócitos circulantes no momento da lesão impede totalmente a regeneração muscular, enquanto a depleção mais tardia diminui o diâmetro das fibras regeneradas. A inflamação tem papel fundamental

no reparo tecidual e para que esse quadro se caracterize, a migração e infiltração de monócitos são essenciais. Os mecanismos que medeiam todo esse processo são complexos, eles envolvem a liberação de citocinas, padrões moleculares associados ao dano (DAMP's, do inglês *damage associated molecular pattern*) e quimiocinas por células musculares e macrófagos residentes para atrair monócitos para a área de inflamação (KHARRAZ et al., 2013). Após a infiltração de monócitos, o seu estado de ativação e o ambiente muscular vai determinar quais citocinas serão secretadas, o que por sua vez, determina em que estágio do reparo esse tecido está (RIGAMONTI et al., 2014).

Os monócitos circulam livremente no sangue até que algum sinal estimule-os a migrar para um tecido. Nas vênulas pós-capilar do local da inflamação, variações hemodinâmicas resultam em redução do fluxo sanguíneo. Essa redução aumenta a probabilidade dos leucócitos fazerem contato com células endoteliais dos vasos. As chances de contato também aumentam pela expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais induzida pela resposta inflamatória (MULLER, 2013). O processo de retirada de uma célula imunitária da circulação e introdução desta no tecido inflamado é complexo, altamente orquestrado e com diversas etapas. A figura 2 resume esses eventos desde a captura até a completa migração da célula.

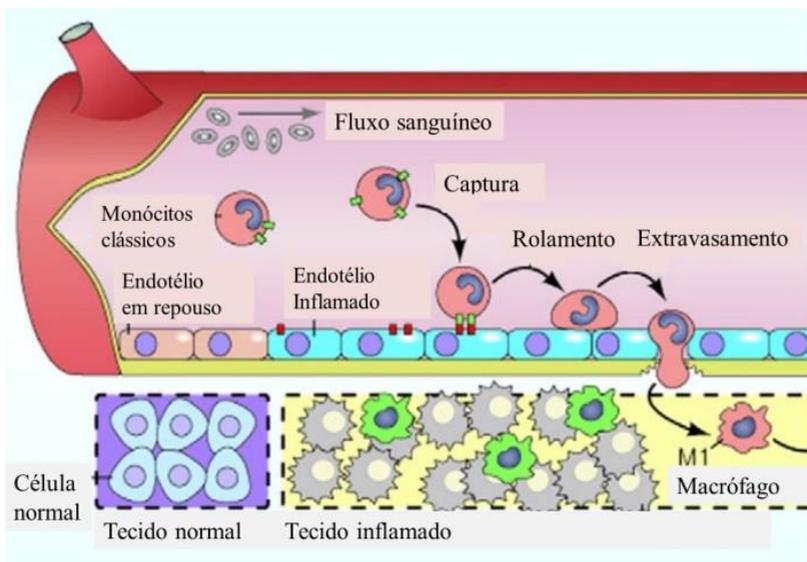


Figura 2 – passos sequenciais da emigração de leucócitos da circulação evidenciando a interação de moléculas específicas nos leucócitos e nas células endoteliais. Adaptado de Lee et al., (2013).

O primeiro passo, chamado marginalização, constitui na retirada dos leucócitos da circulação e tem como efetores principais as selectinas. No entanto, esse ligante promove uma fraca aderência entre as células do sistema imunitário e as células endoteliais. Em seguida, inicia-se o processo de rolling, cuja principal finalidade é deixar os leucócitos em contato com o endotélio para que sejam ativados por quimiocinas secretadas pelo tecido inflamado. O contato das quimiocinas com os receptores de quimiocinas (geralmente por meio de receptores acoplados à proteína G) nos leucócitos ativa uma cascata de sinalização no interior dessa célula, ativando, assim, as integrinas leucocitárias (LEY, 2007). As integrinas são uma família de receptores de adesão existentes no estado quiescente em uma conformação inativa. Anticorpos bloqueadores da função das integrinas, ou mutações genéticas inibidoras da expressão dessas proteínas, não têm repercussões no rolamento. No entanto, o processo de adesão fica muito

comprometido. A ativação das integrinas resulta em uma alteração conformacional a qual favorece a ligação com seus ligantes (MULLER, 2013).

A integrina CD11b faz parte de uma família de quatro membros das integrinas β_2 . Ela é expressa na superfície de neutrófilos, monócitos, macrófagos e células NK (do inglês, *natural killers*) (LUO; CARMAN; SPRINGER, 2007). A CD11b medeia a fagocitose de superfícies opsonizadas e a aderência no endotélio vascular (PIZZA et al., 1996). No processo de reparo muscular, a infiltração de monócitos é muito importante e a integrina CD11b parece atuar ativamente nesses eventos. Após a injeção de uma toxina que provoca dano às miofibrilas, Arnold et al., (2007) observaram que duas ondas de monócitos migram para o músculo esquelético. Dados experimentais mostram que quando a integrina CD11b é inibida, o recrutamento de monócitos para o tecido muscular é prejudicado, resultando em retardo no processo de reparo (CHAZAUD et al., 2009). Esses dados nos mostram a importância desta integrina na função de adesão e migração para o local da lesão.

Arnold et al., (2007) demonstraram que 90 minutos após a injeção de Notexina (uma droga que induz o processo de necrose/regeneração no músculo) no tibial anterior de camundongos, inicia-se uma infiltração de monócitos nesse tecido. Essa infiltração é constatada pelo aumento de monócitos/macrófagos no tecido por análises histológicas, visto que no tecido sadio encontra-se em torno de 200 células/mg de músculo e que 90 minutos após há um aumento de 25% na contagem dessas células. Nesse mesmo estudo, foi possível observar dois picos de infiltração de monócitos, um 2 dias após a injeção da toxina e outro entre 4-7 dias após, correlacionando com o período de maior proliferação de células miogênicas.

Em outro estudo com modelo de lesão muscular induzida por toxina, camundongos deficientes para o receptor C-C tipo 2 (CCR-2), um receptor da proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1, do inglês *monocytes chemoattractant protein*), têm a infiltração de monócitos gravemente prejudicada (enquanto a migração de neutrófilos

e linfócitos é normal) o que resulta em interrupção da angiogênese e regeneração do músculo, acúmulo de tecido fibroso e gotas de gordura no local do dano muscular induzido pela toxina (MARTINEZ et al., 2010). Utilizando-se da abordagem de quimioatração, Chazaud et al. (2003) demonstraram que células precursoras miogênicas sintetizam e secretam altas concentrações de quimiocinas, tais como a quimiocina derivada de macrófagos (MDC, do inglês *macrophage derived chemokin*), MCP-1 e fator de crescimento vasoendotelial (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), nas fases iniciais da diferenciação, declinando progressivamente até atingir níveis similares ao de outros tipos celulares nas fases tardias da diferenciação em miotubos multinucleados. Ainda sobre a síntese e secreção de quimiocinas por células musculares, foi observado em modelo *in vitro* que o bloqueio da síntese de MCP-1, MDC e outras quimiocinas derivadas do músculo, resultam em redução da infiltração de leucócitos e atraso no processo de reparo (BARASH et al., 2004).

Em estudo realizado por Lu et al. (2011) mostrou a participação dos monócitos/macrófagos na resolução da inflamação, crescimento e arquitetura das fibras musculares. Nesse estudo, foi utilizado BaCl₂ para promover dano ao músculo de camundongos e a capacidade de reparo das fibras foi observada em animais com déficit de MCP-1, a principal quimiocina envolvida no recrutamento de monócitos. Foi possível observar que esses animais demonstraram baixa inflamação no terceiro dia após a injeção e presença considerável de fibras necróticas 7 dias após a aplicação de BaCl₂. Os autores também observaram que embora as áreas lesionadas fossem totalmente preenchidas com fibras regeneradas centro-nucleadas, o tamanho das mesmas era significativamente menor. A explicação dada para esse fenômeno foi a menor síntese e secreção de IGF-1, do inglês *insulin growth-factor 1*, que já se sabe ser produzido por monócitos/macrófagos e tem o poder de estimular o crescimento dos miócitos e aceleração da resolução da inflamação (PELOSI et al., 2007).

A participação dos macrófagos no reparo do tecido muscular é sintetizada na figura 3. Nesta podem ser encontrados macrófagos M1

que tem como principal função a fagocitose de debris celulares, células necróticas e apoptóticas, além de secretar citocinas pró-inflamatórias que tem efeito na ativação e proliferação de células satélites. Os macrófagos com polaridade M2 atuam na fase de reparo do tecido, secretando citocinas como IL-10, TGF- β , IGF-1, que tem ação na diferenciação e crescimento de miócitos (RIGAMONTI et al., 2014).

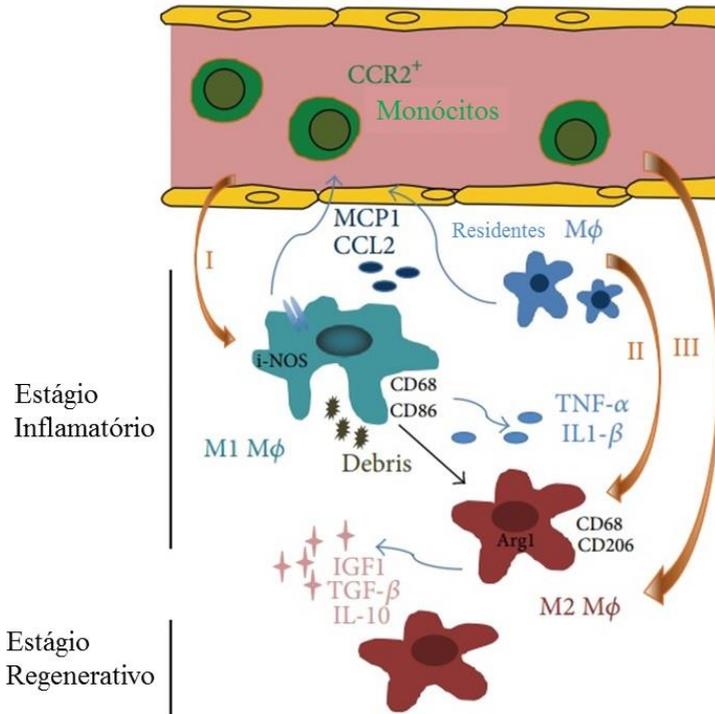


Figura 3 – Atuação dos macrófagos M1 e M2 e as citocinas por eles secretadas nos diferentes estágios do reparo do tecido muscular esquelético. Adaptado de Rigamonti et al., (2014).

Os monócitos clássicos ($CD14^{++}CD16^{-}$) e os macrófagos, principalmente com polarização M1 ou pró-inflamatórios, produzem grandes quantidades de EROs. A produção de EROs por essas células ocorre pela ativação do complexo enzimático NADPH oxidase (Nox)

(FU et al., 2014). A produção de EROs é inerente à atividade dessas células e tem grande impacto em diversos processos celulares, como sinalização celular, apoptose, produção de mediadores inflamatórios, entre outros.

2.2.1 O sistema NADPH oxidase

Oxidoredutases catalisam a transferência de elétrons do redutor (elétron doador) para o oxidante (elétron receptor). Em organismos aeróbios, essas reações químicas estão sempre associadas com a formação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Várias oxidoredutases têm sido identificadas como potenciais origens de superóxidos em células de mamíferos, entre elas estão a cicloxigenase, lipoxigenase, óxido nítrico sintase, xantina oxidase, NADH mitocondrial e NADPH oxidase. A NADPH oxidase (Nox) se diferencia das outras enzimas produtoras de EROs porque ela é uma produtora “profissional” de EROs, onde as outras enzimas produzem EROs apenas como sub-produtos juntamente com suas vias catalíticas específicas, como por exemplo a geração de radicais livres na cadeia de transferência de elétrons das mitocôndrias (JIANG; ZHANG; DUSTING, 2011).

Em recente revisão, Griffiths et al., (2014), sugeriram que provavelmente a origem mais importante ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é a Nox. O complexo NADPH oxidase tem como única função a produção de espécies reativas de oxigênio e tem sido extensivamente investigado em muitos tipos celulares, especialmente fagócitos (FU et al., 2014; JIANG; ZHANG; DUSTING, 2011).

O complexo Nox desempenha um papel chave na defesa contra patógenos pela geração do ânion superóxido e outras EROs. Concentrações elevadas de EROs podem causar dano nas moléculas em torno do tecido envolvido na reação inflamatória. Uma rigorosa regulação da Nox é necessária para evitar danos adicionais ao tecido.

NADPH oxidase é um complexo enzimático com várias subunidades presente na vesícula e membrana plasmática de leucócitos, retículo sarcoplasmático de células musculares, entre outros. Duas subunidades transmembranas, gp91^{phox} e p22^{phox}, formam o flavocitocromo b558, o núcleo catalítico do complexo. Esse heterodímero cataliza e transfere elétrons do NADPH citosólico para a molécula de oxigênio, gerando assim o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Flavocitocromo b558 é regulado pela associação com as subunidades p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox} juntamente com a pequena GTPase Rac. Essas subunidades regulatórias (figura 4) estão presentes no citosol das células em repouso e translocam para o núcleo catalítico após a estimulação (GARDINER et al., 2013).

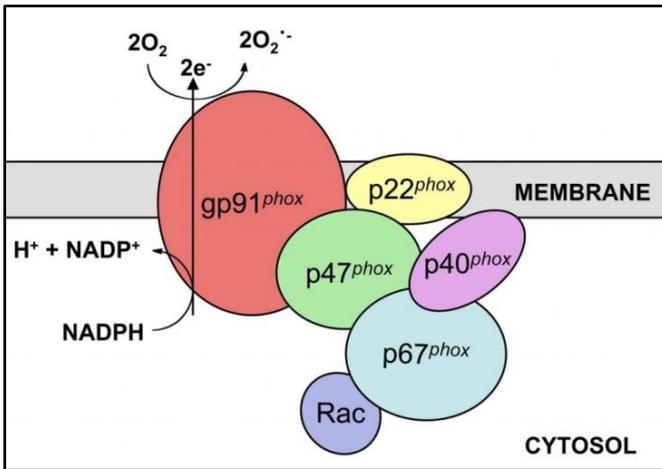


Figura 4 – Representação esquemática do complexo NADPH oxidase. Oxidação de NADPH à NADP⁺ + H⁺ com redução do O₂ à O₂^{•-}, reação catalisada pela NADPH oxidase. Adaptado de Gardiner, et al., (2013).

Devido à presença de vários sítios independentes de fosforilação entre outras características, a p47^{phox} é considerada um dos principais reguladores da atividade da NADPH oxidase, modulando assim a produção de EROs principalmente em células de linhagens fagocíticas (EL-BENNA et al., 2009).

2.2.1.1 p47^{phox}

A p47^{phox} é uma proteína composta de 390 aminoácidos com massa molecular de 44,7 kDa (LOMAX et al., 1989). A sequência de aminoácidos N-terminal da p47^{phox} tem um domínio PX (do inglês, *phox homology*) entre os aminoácidos 4 à 121. Os aminoácidos da região mediana da p47^{phox} também contêm dois domínios SH3 (aminoácidos 159-214, domínio SH3A, aminoácidos 229-248, domínio SH3B). Sua sequência carboxi-terminal tem uma carga básica e é rica em resíduos de serina e arginina, com pelo menos uma região rica em prolina (PRR) (EL-BENNA et al., 2009).

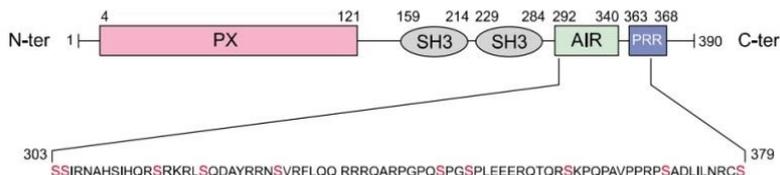


Figura 5 – Representação esquemática da estrutura molecular da proteína p47^{phox}. Adaptado de EL-BENNA et al., (2009).

No estado de repouso, os dois domínios SH3 da p47^{phox} interagem intramolecularmente com a região C-terminal da proteína não fosforilada para manter a p47^{phox} em um estado auto inibido. Por essa razão, a região C-terminal é conhecida como região auto inibitória (EL-BENNA et al., 2009). No que diz respeito ao papel dos sítios de fosforilação da p47^{phox} na ativação da Nox, resultados obtidos de mutações combinadas de todas as serinas fosforiladas (Ser315, Ser 320, Ser328, Ser345, Ser348, Ser359, Ser370 e Ser379) demonstraram que a fosforilação da p47^{phox} é absolutamente necessária para a ativação da Nox. Mutações individuais de cada serina mostraram que apenas a mutação da serina 379 para alanina inibiu completamente a ativação da Nox, enquanto mutação apenas da serina 303, ou da 304, 328, 359 ou 370 para alanina inibiram quase 50% da ativação deste complexo.

Ainda, mutação da serina 315 ou 320 ou 348 para alanina não demonstraram efeito (FAUST et al., 1995).

Quando a célula está em repouso, quase 100% da p47^{phox} localizam-se desacoplada da Nox no citosol ou em um complexo equimolar contendo p67^{phox} e p40^{phox}. Durante ativação, aproximadamente 10-20% dessas proteínas migram para a membrana plasmática e 80-90% da p47^{phox} permanecem no citosol. A p47^{phox} é a subunidade responsável por transportar todo o complexo citosólico (p47^{phox}-p67^{phox}-p40^{phox}) para o local de ancoragem – citocromo b558 (gp91^{phox}/NOX2 e p22^{phox}) – durante a ativação da NADPH oxidase (EL-BENNA et al., 2009).

A p47^{phox}, com seus diferentes domínios e vários sítios de fosforilação, é o principal regulador da ativação da Nox, por organizar o complexo (EL-BENNA et al., 2009). Isso a torna uma interessante ferramenta de estudo quando a atividade da Nox precisa ser avaliada.

2.2.2 Espécies reativas de oxigênio oriundas da Nox

Os átomos possuem elétrons que geralmente são distribuídos em pares. Cada par se move em um espaço definido em torno do núcleo, chamado de orbital atômico. Se um átomo/molécula contém um ou mais elétrons desemparelhados e é capaz de existir independentemente, ele é chamado de “radical livre” (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). É importante notar que o termo EROs é um termo genérico que não se refere apenas aos radicais livres com elétrons desemparelhados, mas também para os derivados do oxigênio como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

As EROs são formadas por diversas vias de oxidação/redução a partir do O₂. Cada intermediário tem suas propriedades, efeitos e características, que multiplicam a complexidade dos estudos nessa área. Na figura 6 é possível observar a cinética de eventos a partir do O₂ e a formação de radicais livres intermediários.

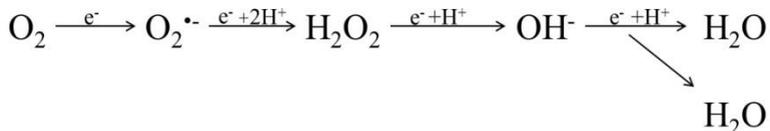


Figura 6 – Redução completa do O₂ à H₂O com geração de radicais livres intermediários. Adaptado de HALLIWELL (1994).

O ânion radical superóxido (O₂^{•-}) é formado como um intermediário em reações bioquímicas com o O₂. Negativamente carregado, ele possui pouca permeabilidade na membrana plasmática e meia-vida relativamente longa quando comparado com outros radicais livres (HALLIWELL, 1994). A dismutação do superóxido pode ser realizada pela enzima superóxido dismutase (SOD), que é a principal via de produção do H₂O₂, conforme a reação demonstrada na figura 7.

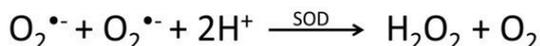


Figura 7 – dismutação do ânion radical superóxido pela superóxido dismutase (SOD). Adaptado de HALLIWELL (1994).

O H₂O₂ não é um radical livre, mas é um intermediário de reações que ocorrem com o O₂. O peróxido de hidrogênio é estável, permeável em membranas e tem meia vida relativamente longa dentro das células. A citotoxicidade do peróxido de hidrogênio ocorre principalmente por sua habilidade de gerar o radical hidroxil (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) por meio de reações catalisadas por metais (Reação de Fenton) ou por reações com o ânion radical superóxido na presença de íons metálicos (Reação de Haber-Weiss) (YU, P. B. 1994), ambas as reações são apresentadas na figura 8.

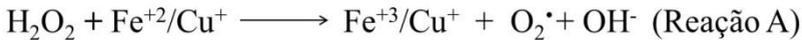


Figura 8 – Reação de Fenton (A) formação do radical hidroxil a partir do peróxido de hidrogênio com íons de ferro ou de cobre. Reação de Haber-Weiss (B) formação do radical hidroxil a partir da reação do peróxido de hidrogênio com o ânion radical superóxido na presença de íons metálicos. Adaptado de HALLIWELL (1994).

O aumento da geração de EROs parece ser uma resposta comum em células expostas ao estresse, assim, é especulado que a regulação redox pode representar um importante sistema de segundo mensageiro que está envolvido na cascata de sinalização da célula exposta ao estresse (JIANG; ZHANG; DUSTING, 2011). É importante salientar que as implicações biológicas das EROs ainda não são totalmente compreendidas. Nos últimos anos, evidências têm apontado o papel dessas moléculas em processos de apoptose, ativação e desativação de vias de sinalização, estimulação de respostas de preservação da vida celular, entre outros processos vitais para o organismo. Esses dados vão de encontro com a sua função proposta inicialmente, em que elas eram postas apenas como danosas aos organismos (POWERS; JACKSON, 2008).

No que tange a fisiologia da contração muscular, as EROs, que antes apenas eram tidas como subprodutos da atividade mitocondrial, têm se destacado por seu papel na função primordial desse tecido. Tem sido proposto que as EROs são necessárias para a capacidade de produção de força no músculo esquelético. E que em condições basais há uma produção normal na força, no entanto, se houver uma diminuição nas concentrações de EROs (mediada por antioxidantes), há também uma diminuição da produção da força. Por outro lado, um aumento nas EROs no músculo conduz à maior produção de força até determinado momento, quando o aumento nas concentrações ou o

período prolongado de exposição às EROS leva a uma diminuição na eficiência contrátil do músculo (REID; KHAWLI; MOODY, 1993). Representação gráfica do comportamento da célula muscular perante as concentrações de EROs pode ser visto na figura 9 proposta por Reid, (2001).

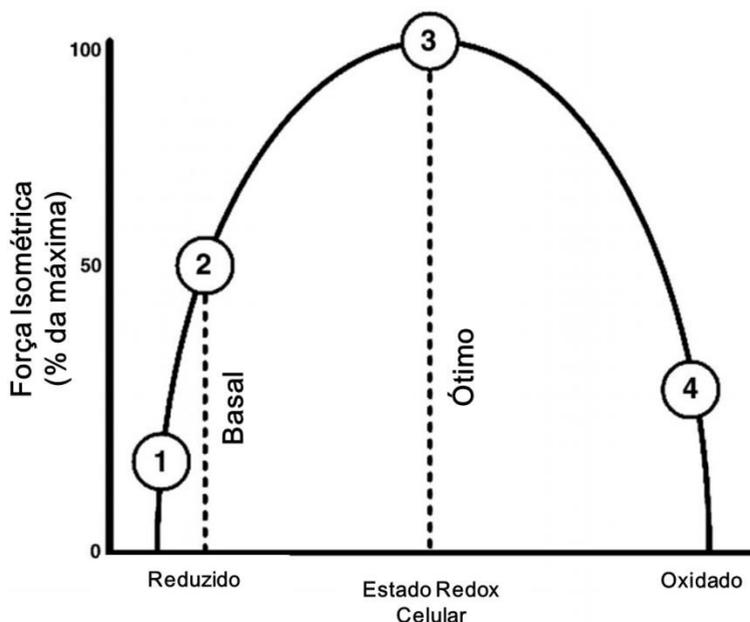


Figura 9 – modelo proposto dos efeitos bifásicos das EROS na produção de força pelo músculo esquelético. O ponto 1 representa a produção de força sob condições de baixas EROs mediada por anti-oxidantes. O ponto 2 representa condições basais do músculo. O ponto 3 representa um leve incremento nas EROs em fibras não fadigadas, e por fim, o ponto 4 representa um efeito deletério pelo excesso de EROs ou exposição prolongada à elas (REID, 2001).

As razões pelas quais a capacidade de produção de força é modulada pelas EROs ainda são motivo de discussão e pesquisa. Até o momento, acredita-se que os efeitos das EROs na eficiência muscular podem ser devido a alterações no manejo e sensibilidade ao cálcio

(Ca²⁺) pelos miofilamentos (POWERS; JACKSON, 2008; DROGE, 2002) e também pela atuação das EROs em vias de sinalização celular em sítios sensíveis às modificações no estado redox. Quando o músculo esquelético é exposto a EROs exógenas, os receptores de rianodina (RyR1) são ativados e conseqüentemente, liberam Ca²⁺ para fora do retículo sarcoplasmático (RS) (ANZAI et al., 2000). Aparentemente, os RyR1 estão intimamente associados com a Nox encontrada no retículo sarcoplasmático, visto que o ânion radical superóxido parece ser a principal EROs capaz de influenciar esta classe de canais de Ca²⁺ (XIA et al., 2003).

Em revisão escrita por Smith e Reid, (2006) destacou-se que proteínas estruturais do músculo podem sofrer ações das EROs e, portanto, alterar a sua função. Dentre as razões destacadas pelos autores, estão altas concentrações de EROs que podem alterar a estrutura dos miofilamentos; a diminuição da sensibilidade ao Ca²⁺ nos miofilamentos; alteração da cinética das pontes cruzadas. Estudos têm tentado identificar exatamente quais proteínas estruturais e contráteis são sujeitas às EROs, e foi demonstrado que dentre várias proteínas sujeitas às intervenções pelas EROs, a proteína de cadeia pesada da miosina é alvo das EROs e a oxidação dessas miosinas promove prejuízo à sua função (YAMADA et al., 2006). Adicionalmente, a troponina C também é sensível à oxidação por esses agentes, conseqüentemente tendo a sua sensibilidade ao Ca⁺⁺ alterada (PLANT; LYNCH; WILLIAMS, 2000).

No entanto, a ação das EROs vai muito além da atuação nas propriedades contráteis. Como citado anteriormente, elas podem atuar na transdução de sinais celulares, incluindo vias dependentes do Ca²⁺, proteínas cinases e fosfatases de tirosina, cinases de serina e treonina e fosfolipases (JACKSON et al., 2002). Os efeitos das EROs nas cascas de sinalização celular são dependentes do tipo de molécula (i. e. ânion radical superóxido, radical hidroxila, entre outros), do tipo celular em que essa molécula está agindo e também da sua origem (i.e. células fagocíticas do sistema imunitário, organelas envolvidas no metabolismo, entre outros). Lander et al., (1997) propuseram que as EROs poderiam

atuar no controle da síntese e secreção de citocinas e fatores de crescimento, transporte de íons, apoptose, liberação e ação de hormônios, transcrição e neuromodulação. No entanto, outras ações têm sido observadas dessas moléculas, como aumento ou diminuição da proliferação celular, indução de morte por apoptose e alteração da função imunitária (DROGE, 2002; JACKSON et al., 2002).

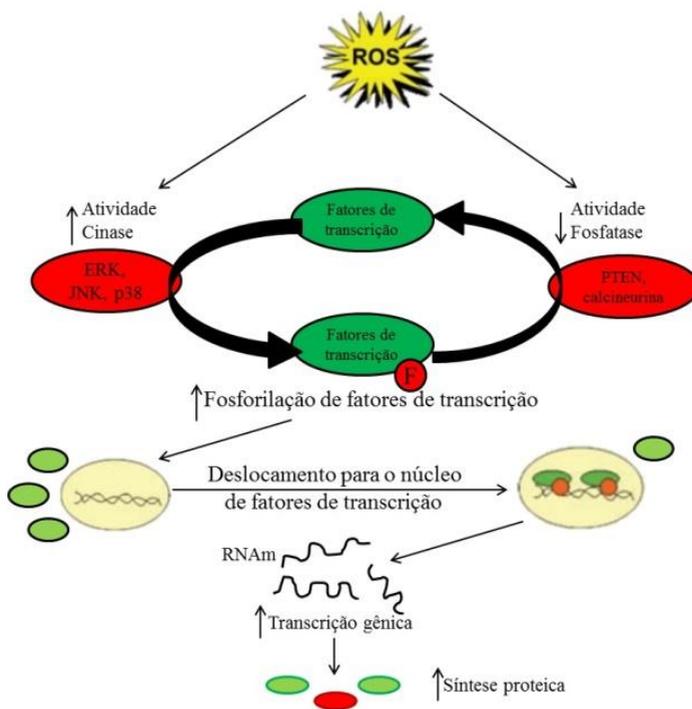


Figura 10 – Sinalização celular mediada por EROs. Esquema representativo da interação de cinases e fosfatases com EROs na regulação de fatores de transcrição na síntese de proteínas no músculo esquelético (Adaptado de POWERS et al., 2009).

Uma família importante de cinases influencia diversas respostas no músculo esquelético frente a estímulos externos e internos

(POWERS et al., 2009). Estas são as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), elas contribuem para a regulação de diversas vias de ativação e desativação de fatores de transcrição, decisões de apoptose ou manter a sobrevivência da célula, fazendo delas fundamentais para a homeostase do organismo. Existem várias subfamílias de MAPK, entre as mais estudadas estão a cinase N-terminal c-Jun (JNK), p38 e a cinase regulada por sinal extracelular (ERK). Foi visto que essas três subfamílias são ativadas por EROs atuando na resposta da célula perante um estímulo, no entanto, o completo entendimento dos seus efeitos ainda é alvo de pesquisa (CHEN et al., 2001).

2.2.2.1 Peroxidação lipídica

Devido à sua instabilidade característica, as EROs têm alta reatividade em sistemas biológicos, essa alta reatividade tem o objetivo de adquirir a estabilidade de sua composição química. O potencial reativo das EROs é demonstrado na lipoperoxidação (LPO). Peroxidação lipídica pode ser descrita em termos gerais como o processo, sob condições oxidantes, em que radicais livres atacam lipídeos que contém duplas ligações de átomos de carbono, especialmente ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (AYALA; MUÑOZ; ARGUELLES, 2014; HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

O processo de peroxidação lipídica consiste de três fases: iniciação, propagação e terminação. No momento denominado iniciação, os radicais livres retiram um hidrogênio formando um radical lipídico (L^{\bullet}). Na fase de propagação, o radical formado na reação anterior rapidamente reage com o O_2 para formar o radical peroxila (LOO^{\bullet}) que abstrai um hidrogênio de outra molécula de lipídeo gerando um novo L^{\bullet} e um hidroperóxido lipídico (LOOH). Na última reação, denominada terminação, antioxidantes doam um átomo de hidrogênio ao LOO^{\bullet} e após mais uma reação formam um produto não radical (YIN; XU; PORTER, 2011). Essas etapas podem ser visualizadas na figura 11.

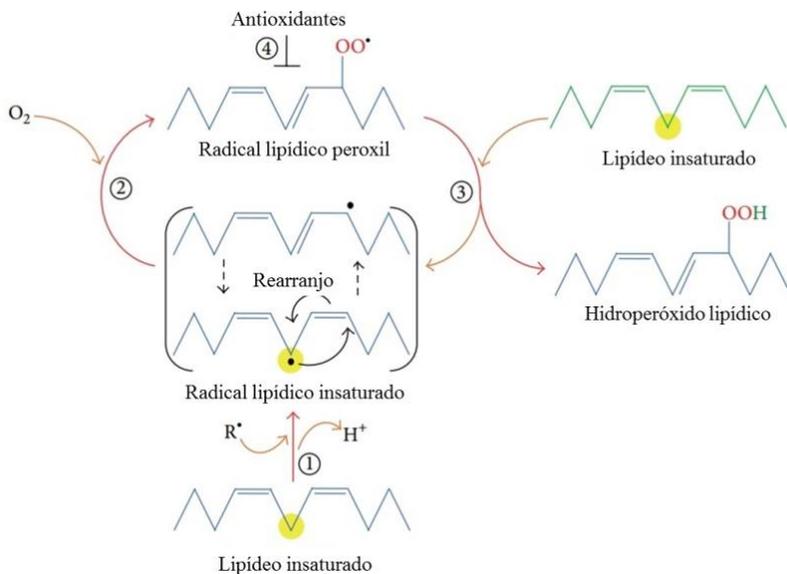


Figura 11 – Oxidação de lipídeos por radicais livres, processo denominado peroxidação lipídica. (1) Iniciação; (2,3) Propagação; (4) Terminação. Para detalhes da reação, consultar o texto. Modificado de AYALA; MUÑOZ; ARGUELLES, 2014.

A peroxidação lipídica tem sido estudada em diversos modelos de exercício, principalmente nos que visam estudar as variações em marcadores de estresse oxidativo após protocolos de lesão induzida por ações musculares (MARGARITELIS et al., 2014; QUINDRY et al., 2011; THIRUMALAI et al., 2011; CHILDS et al., 2001). Para esses modelos de lesão induzidos pelo exercício, diversos produtos da peroxidação lipídica têm sido investigados, como por exemplo, as substâncias reativas do ácido triobarbitúrico (TBARs) (THIRUMALAI et al., 2011), substâncias oriundas da cascata do ácido araquidônico, como o F_2 -Isoprostano (MARGARITELIS et al., 2014) e os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (QUINDRY et al., 2011; CHILDS et al., 2001).

Derivados de fosfolipídeos insaturados, glicolipídeos e colesterol, os LOOH são intermediários proeminentes de reações de peroxidação induzida por radicais livres, tais como ânion radical superóxido, radical hidroxila, oxigênio singlet entre outros. A importância de se mensurar os hidroperóxidos lipídicos é que eles são produtos primários da peroxidação (fase de propagação) dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), visto que a maioria dos outros métodos avalia seus produtos de degradação (YAMAMOTO, 1994). Os LOOH têm sido apontados como marcadores confiáveis no plasma para mensurar o estresse oxidativo em tecidos (ARGUELLES et al., 2004).

2.2.2.2 Carbonilação de proteínas

Não somente os lipídeos são alvos das EROs, mas também outras moléculas como as proteínas. As proteínas são formadas pela junção de diversos aminoácidos, formando estruturas tridimensionais que exercem diversas funções no organismo, como produção de força, transporte de moléculas, regulação de sistemas endócrinos e inflamação, entre outros (GRIFFITHS et al., 2014).

Grupos carbonil são produzidos nas cadeias laterais das proteínas, especialmente dos aminoácidos leucina, valina, isoleucina, prolina, arginina, lisina e treonina (Zuo et al., 2015). No entanto, outras formas de adição do grupo carbonil nas proteínas podem existir. Grupos carbonil podem ser introduzidos nas proteínas por reações secundárias por meio das espécies avançadas de glicosilação (AGES) ou com aldeídos (4-hidroxi-2-nonenal, malondialdeído) produzidos durante a peroxidação lipídica (DALLE-DONNE et al., 2003). A presença e concentração de proteínas modificadas circulantes no plasma dependem das taxas de síntese, modificação e *clearance* de proteínas (GRIFFITHS et al., 2014).

Alguns estudos têm observado as alterações nas concentrações de proteínas carboniladas após modelos de dano induzido por exercício

(QUINDRY et al., 2011; SILVA et al., 2010) e frequentemente têm encontrado aumento nas concentrações desse produto do estresse oxidativo. No entanto, o desenho desses estudos não tem objetivado realizar acompanhamento temporal para identificar o comportamento do estado oxidativo na recuperação da função muscular (MARGARITELIS et al., 2014), ou atentaram para intervenções nutricionais, não focando apenas nos efeitos do exercício físico sobre as repercussões do dano no tecido (SILVA et al., 2010).

2.3 MODELOS DE DANO AO MÚSCULO ESQUELÉTICO

O músculo esquelético é o tecido mais abundante nos seres humanos eutróficos, constitui-se em um órgão altamente adaptável frente às demandas ambientais e fisiológicas. A alta adaptabilidade do músculo esquelético resulta da sensibilidade aos estímulos tais como atividade contrátil (exercício de endurance, estimulação elétrica), condições de carga (treino contra-resistido e microgravidade), disponibilidade de substratos (intervenções nutricionais), perfil hormonal (hormônios da tireóide e testosterona), e fatores ambientais (hipóxia) (SACLIER et al., 2013; TIDBALL; VILLALTA, 2010).

Dados experimentais mostram que o esmagamento do músculo, a morte por injeção de toxinas, destruição mecânica por alongamentos excessivos ou danificar fibras musculares por congelamento podem ser seguidas por eficiente regeneração do músculo que conduz a recuperação da estrutura e função dessas células, e por consequência, desse tecido (TIDBALL; VILLALTA, 2010). Muitos estudos que visam compreender a regeneração do músculo esquelético utilizam modelos agudos de lesão e reparo, tais como injeção de toxinas (ARNOLD et al., 2007), ou BaCl₂ (LU et al., 2011), isquemia reperusão (MERCHANT; GURULE; LARSON, 2003). Esses modelos são úteis para a compreensão do *time course* do processo de reparo, no entanto, eles não refletem as condições fisiológicas e habituais em que o músculo é submetido nas atividades cotidianas.

Após ter sido danificado, o músculo esquelético inicia um trabalho para a regeneração. Células satélites são ativadas e proliferam como mioblastos e se fundem em miotubos no local do dano, onde posteriormente se diferenciam em fibras musculares totalmente regeneradas (TIDBALL, 2004). Essa sequência é mediada por uma cascata de fatores regulatórios miogênicos que estão sujeitos à sinalização de macrófagos residentes e infiltrados. A fase proliferativa dos mioblastos é promovida por macrófagos pró-inflamatórios (M1), subsequente a esta, macrófagos com fenótipo M2 estimulam a diferenciação e crescimento dos miotubos (ARNOLD et al., 2007).

2.3.1 O exercício excêntrico

A contração excêntrica é caracterizada pela produção de força enquanto o músculo está sendo alongado. Quando as miofibrilas dentro desse tecido são estiradas durante a esse tipo de ação muscular, alguns sarcômeros são mais resistentes a esse alongamento do que outros. Conseqüentemente, os sarcômeros mais fracos absorvem mais desse alongamento, e dependendo do quão alongado eles serão, enfraquecerão até que exista pouca ou nenhuma ligação entre os miofilamentos (PEAKE; NOSAKA; SUZUKI, 2005).

Teoria postulada por Proske e Morgan (2001) coloca que os filamentos elásticos de titina, que fazem a ancoragem do final da cadeia pesada da miosina com os discos Z, trabalham de forma independente. Esse conceito é importante porque um sarcômero não deve ser visto como um, mas sim, como dois meio sarcômeros. Esses autores colocam esse conceito porque quando um sarcômero é muito alongado (além do seu comprimento ótimo) a metade mais fraca dele cede para que a outra metade possa trabalhar em um comprimento mais favorável. Evidentemente, essas metades que cedem são mais fracas que as outras, ficando mais sujeitas a ruptura promovida pelas ações excêntricas. Durante repetidas contrações excêntricas, primeiramente os sarcômeros mais fracos seguidos pelos mais fortes são progressivamente sendo estirados mecanicamente. Durante a fase de relaxamento, os miofilamentos desses sarcômeros podem falhar em se reconectar,

resultando em sarcômeros rompidos. Essa ruptura estrutural pode afetar áreas adjacentes do músculo, e produzir dano em membranas do retículo sarcoplasmático, túbulos transversos ou sarcolema (PEAKE; NOSAKA; SUZUKI, 2005).

Tem sido mostrado que contrações excêntricas resultam em maiores danos morfológicos e funcionais em músculos esqueléticos humanos do que contrações concêntricas (NEWHAM et al., 1983; MALM et al., 2004). O primeiro sinal físico de dano é a ruptura dos sarcômeros, dos discos Z e danos aos componentes do sistema de acoplamento excitação-contração (E-C) (FEASSON, 2002; WARREN et al., 2001). Aparentemente os danos estruturais são os maiores responsáveis pelo prolongado decaimento na capacidade de produção de força, entre eles estão os filamentos elásticos de titina, que ancoram os filamentos grossos (miosinas) aos discos Z, os próprios discos Z e a inativação de alguns sarcômeros por dano aos túbulos T também tem sido citada. As lesões nos filamentos contráteis do músculo têm sido apontadas como razões para esse prejuízo funcional em dias (PROSKE & MORGAN, 2001).

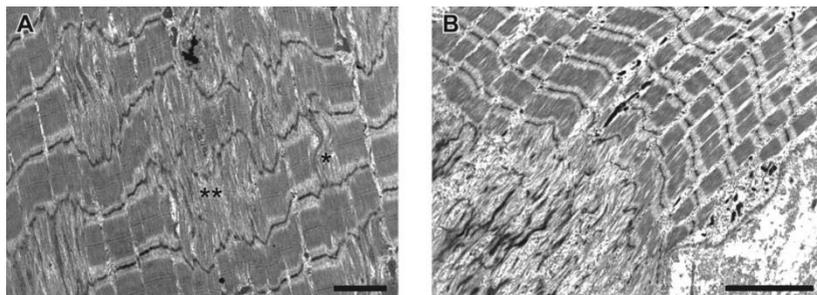


Figura 12 – Micrografia eletrônica do bíceps braquial demonstrando ruptura dos discos Z após a realização de 70 repetições excêntricas (LAURIZTEN et al., 2009).

Essas alterações estruturais após o exercício excêntrico têm repercussões diversas. Elas podem ser vistas sistemicamente e também na função muscular. Um processo de reparo eficiente está atrelado à

manutenção dessas alterações no período após o dano e recuperação precoce das funções dessa célula.

2.3.2 Marcadores indiretos de dano muscular

O dano muscular tem sido mensurado por metodologias diretas ou indiretas. Atividades plasmáticas de creatina cinase (CK) e aldolase, escalas de dor e amplitude de movimento, e produção de força são as medidas indiretas mais utilizadas (BLACKWELL et al., 2015; KANDA et al., 2014; JAMURTAS et al., 2005).

Historicamente, um processo inflamatório é caracterizado por cinco pontos cardinais, são eles: tumor, dor, calor, rubor e perda de função. O prejuízo funcional – por exemplo, redução na capacidade de geração de força – é imediato, prolongado e talvez o mais importante sintoma quando considerado na presença de dano muscular. Mensuração da função muscular pode prover o mais efetivo meio de avaliação da magnitude e o *time course* do dano resultado das ações musculares excêntricas (PAULSEN et al., 2012; BYRNE; TWIST; ESTON, 2004). A força muscular pode ser reduzida em torno de 50% ou mais durante as primeiras 24 horas após o exercício, e gradualmente recuperar a funcionalidade em torno de 5 a 10 dias dependendo da intensidade do dano e do músculo utilizado (PAULSEN et al., 2012). A mensuração da força isométrica tem sido o método mais utilizado para determinação da função muscular após o exercício excêntrico. Esse método envolve uma contração voluntária máxima (CVM) em uma articulação com ângulo fixado por 2 a 5 segundos (BYRNE; TWIST; ESTON, 2004).

A dificuldade de se ter amostras teciduais para avaliar o dano causado ao músculo pelo exercício excêntrico, tem conduzido para avaliações de marcadores indiretos presentes no soro dos sujeitos. As atividades da creatina cinase (CK) e da aldolase têm sido utilizadas como marcadores de lesão celular por entrar na circulação após a membrana plasmática do músculo ter sido lesionada. As concentrações desses indicadores de dano podem depender do sexo do indivíduo,

intensidade do exercício e duração, massa muscular e estado de treinamento (KANDA et al., 2014).

Em recente revisão, Kock, Pereira e Machado (2014), expuseram que a CK pode aumentar mais que 100% sua atividade no plasma dentro de poucas horas do término do exercício até 96 horas, com valores de pico encontrados em todos os momentos desse intervalo. A CK pode estar sujeita a variações pela composição corporal, sexo, quantidade de trabalho realizada no protocolo de dano, tipo de fibra muscular envolvida, velocidade e amplitude de movimento.

A aldolase é uma enzima presente em diversos tipos celulares e está envolvida na via glicolítica do metabolismo das células. Embora a atividade dela possa sofrer interferência da idade e do estado de treinamento do indivíduo, tem sido proposto que a utilização dessa enzima juntamente com a CK possa ser útil como marcador indireto de dano muscular (BRANCACCIO; LIPPI; MAFFULLI, 2010). A atividade da aldolase no soro, embora menor que da CK, tem considerável menor variação entre os indivíduos, o que pode favorecer o seu uso principalmente em pequenas amostras (KANDA et al., 2014)

Aparentemente, o grupo muscular utilizado nos protocolos de exercício varia tanto em magnitude de dano quanto em respostas ao dano, como dor, amplitude de movimento, extravasamento de conteúdos intramusculares para a circulação. Isso dificulta a comparação dos dados, visto que já existe uma variabilidade muito grande de protocolos (i.e. downhill vs. uphill; contração isométrica vs. concêntrica vs. excêntrica). O bíceps braquial, quando comparado ao quadríceps, é mais sujeito aos danos induzidos pelo exercício excêntrico e, também, necessita de mais tempo para a recuperação completa (JAMURTAS et al., 2005).

3 JUSTIFICATIVA

A participação dos monócitos no reparo de diversos tecidos tem sido evidenciada em diversos estudos. No entanto, os mecanismos envolvidos no processo de migração e função dos monócitos ainda não são totalmente esclarecidos. Nesse complexo sistema, quimiocinas atrativas, citocinas sinalizadoras, moléculas de migração, adesão e diapedese, sistemas de fagocitose estão continuamente sendo estudados para caracterizar todo o funcionamento dessa célula no processo de reparo.

Nesse cenário, o músculo estriado esquelético recebe destaque pela sua capacidade de adaptação frente a situações diversas (i. e. exercício físico, uso inabitual, desuso, doenças catabólicas, estado nutricional). Também pela facilidade em promover danos de forma experimental, avaliá-los e acompanhá-los durante o processo de reparo. Muitos modelos animais utilizam como ferramenta para causar dano ao tecido muscular injeções de substâncias tóxicas, congelamento, esmagamento, entre outras. No entanto, esses contextos nem sempre simulam os eventos fisiológicos ocorridos em humanos e/ou em situações do cotidiano.

Dessa forma, avaliar a participação, pelo seu fenótipo e outros atributos, dos monócitos e o seu envolvimento no processo de reparo do tecido muscular causado por exercício excêntrico em humanos se faz necessária para compreender os eventos particulares dessas células imunitárias no reparo desse tecido em específico.

4 HIPÓTESES

Esse estudo inicia com as seguintes hipóteses:

H₁ O protocolo de dano induzirá alterações na capacidade de produção de força dos indivíduos nos dias subsequentes ao dano.

H₂ Marcadores bioquímicos de dano muscular poderão sofrer alterações a níveis plasmáticos.

H₃ O fenótipo e expressão da p47^{phox} em monócitos serão alterados em função do seu potencial reparador.

H₄ Marcadores de estresse oxidativo estarão diferentes nos momentos observados.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o conteúdo da p47^{phox} e o fenótipo de monócitos após dano muscular promovido por exercício excêntrico em homens saudáveis.

5.1.1 Objetivos específicos

- Observar a alteração da capacidade de produção de força após o dano induzido por exercício excêntrico.

- Avaliar o dano muscular por meio dos marcadores bioquímicos indiretos creatina cinase e aldolase.

- Verificar os valores, absolutos e relativos, para linfócitos, neutrófilos e monócitos durante o período, em dias, de recuperação após o dano muscular.

- Identificar as subpopulações de monócitos como CD14⁺⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺.

- Averiguar a expressão da p47^{phox} e da CD11b em células CD14⁺.

- Verificar os danos oxidativos em proteínas e lipídeos plasmáticos.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

Nessa sessão será abordada toda a metodologia referente a esse estudo. O desenho experimental e o protocolo de dano serão tratados no início e, posto isto, serão descritas as ferramentas utilizadas para mensuração das variáveis escolhidas e análise dos dados gerados.

6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O estudo foi do tipo transversal, descritivo e quantitativo. O protocolo experimental teve duração de quatro dias corridos, sendo estes denominados: Dia 1, coleta de sangue antes da execução dos exercícios excêntricos, teste de força isométrica máxima e execução do exercício proposto; após 24 horas (dia 2), 48 horas (dia 3) e 72 horas (dia 4) foram realizadas novas coletas de sangue e subsequente a estas, um teste de força isométrica máxima (figura 13). Os participantes realizaram uma adaptação ao aparelho utilizado e também ao exercício na semana que antecedeu o experimento.

Antes do início do protocolo experimental os participantes receberam informações pertinentes ao estudo. Essas informações foram: (i) manter suas atividades físicas habituais e as interrompendo 48 horas antes do início dos testes; (ii) manter seus hábitos alimentares; (iii) abstenção de bebida alcoólica e a restrição de bebidas que continham cafeína (café, chás, refrigerantes etc). As variáveis de controle foram: sexo, idade, nível de atividade física e prática de exercício resistido. As variáveis intervenientes foram: dieta, lateralidade do membro testado, prática de atividade física e nível de aptidão física. A fim de reduzir o efeito das variáveis intervenientes nos resultados do estudo, foram realizados procedimentos de randomização na designação do membro superior que a ser inicialmente testado.

O protocolo experimental foi aprovado Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o CAAE 16832613.8.0000.0121.

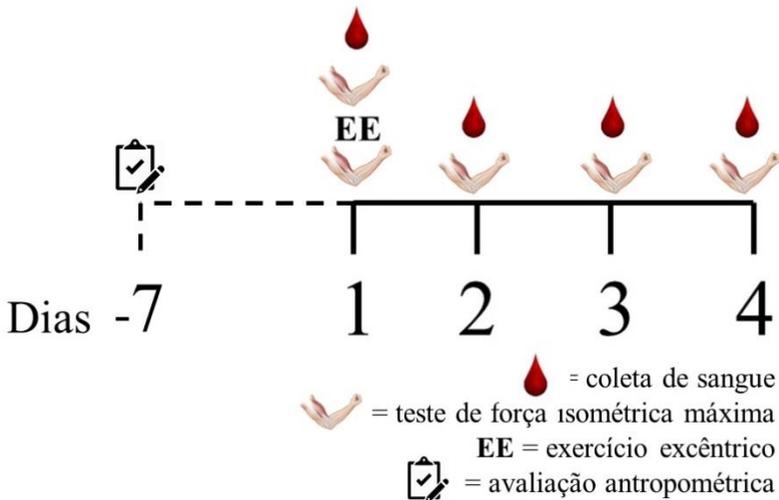


Figura 13 – representação esquemática do desenho experimental. EE = exercício excêntrico. Fonte: o autor.

6.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

A amostra foi constituída por indivíduos do sexo masculino, com idade de 19 a 30 anos, alunos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e residentes na cidade de Florianópolis, Santa Catarina. Os participantes foram selecionados por meio de cartazes fixados nos murais dessa instituição, e-mails, telefone e contatos diretos com os alunos. A amostra foi selecionada de forma intencional, de modo a atender os seguintes critérios de inclusão: (i) não fumante; (ii) não portador de quaisquer desordens metabólicas, processos infecciosos ou inflamatórios visíveis ou conhecidos; (iii) fisicamente ativos, mas não envolvidos em treinamentos contra resistência ou aeróbios sistematizados nos três meses precedentes ao estudo; (iv) não usuário de

medicamentos ou de fitoterápicos; e (v) não usuário de substâncias ergogênicas, tais como creatina, arginina e cafeína, ou suplementos de macro e micronutrientes.

6.3 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E NÍVEIS DE ATIVIDADE FÍSICA

Na semana anterior ao início do protocolo experimental foram realizadas as mensurações de peso corporal, estatura e dobras cutâneas. Os dados antropométricos foram coletados no Laboratório de Biomecânica da Universidade Federal de Santa Catarina. Os indivíduos foram avaliados pela manhã, descalços, com roupas leves e antes de qualquer atividade esportiva. Registrou-se a massa corporal em quilogramas, empregando-se balança eletrônica (Toledo®, Brasil), com resolução de 100 g. Verificou-se a estatura com estadiômetro de parede (Seca®, Hamburgo, Alemanha), com resolução de 1 mm. As dobras cutâneas, tricipital (TR), suprailíaca (SI) e abdominal (AB), foram mensuradas por meio de adipômetro científico (Cescorf Equipamentos®, Porto Alegre, Brasil), com escala de 0,1 mm. A densidade corporal foi estimada utilizando-se a seguinte equação desenvolvida por Petroski (1995): $1,10726863 - 0,00081201 (\Sigma 4SF) + 0,00000212 (\Sigma 4SF)^2 - 0,0004176$, onde $\Sigma 4SF$ representa o somatório das dobras cutâneas tricipital, subescapular, supra ilíaca e panturrilha medial. O valor da densidade corporal foi usado na estimativa do percentual de gordura corporal, segundo a equação de Siri: $\% \text{Gordura corporal} = (495 / \text{densidade corporal}) - 450$ (1961 apud PETROSKI, 1995). Após as avaliações antropométricas, os voluntários responderam ao questionário internacional de atividade física (IPAQ - versão curta) (Anexo I). Validado em população brasileira, esta ferramenta avalia o tempo gasto em atividades (trabalho, lazer ou esporte) na última semana (MATSUDO et al., 2001). O IPAQ inclui os seguintes níveis de classificação: muito ativo, ativo, irregularmente ativo, irregularmente ativo A, irregularmente ativo B e sedentário (Anexo II). As avaliações antropométricas foram realizadas por avaliadores experientes, no Laboratório de Biomecânica da Universidade Federal de Santa Catarina.

6.4 PROTOCOLO DE TESTES

O exercício excêntrico foi realizado em dinamômetro isocinético Biodex System 4 Pro® (Biodex Medical System, Inc., Shirley, NY, USA), o qual permite, sob determinação prévia, a realização de movimentos de flexão-extensão, onde o braço de alavanca se move em velocidade angular constante (i.e. isocinética). No equipamento, o desempenho muscular avaliado foi quantificado e registrado por meio de software e as informações foram visualizadas na tela de computador.

Antes do protocolo de dano muscular os indivíduos realizaram um aquecimento composto por 1 série concêntrica/excêntrica à 120°s^{-1} para flexores do cotovelo. Após o aquecimento, cada sujeito realizou 60 repetições voluntárias isocinéticas excêntricas, divididas em três séries de 20 repetições com intervalo de 2 minutos entre cada série. O músculo primário utilizado neste exercício foi o bíceps braquial. Conforme ilustrado na figura 12, os sujeitos permaneceram sentados em um banco com o braço posicionado em frente ao corpo em um suporte apropriado, e o antebraço foi mantido na posição supinada em toda a execução do movimento. Os indivíduos executaram somente o movimento excêntrico, com início em um ângulo de 70° e término com a extensão parcial do braço, ou seja, 150° . A velocidade de movimento foi determinada em 45°s^{-1} .



Figura 14 – Imagem representando diferentes fases (90°; 120° e 150°) do exercício excêntrico para flexores do cotovelo utilizado como protocolo de dano ao músculo esquelético. Fonte: o autor.

6.5 TESTE DE FORÇA ISOMÉTRICO

Antes do teste de contração voluntária isométrica máxima (CVIM), os indivíduos realizaram um aquecimento composto de 3 séries de maneira submáxima à 90°. Para a obtenção da CVIM, antes e após o exercício excêntrico, os voluntários realizaram três ações musculares isométricas voluntárias máximas, num ângulo de 90° na articulação do cotovelo, com 3 segundos de contração cada e 2 minutos de intervalo, conforme ilustrado na figura 13. Durante o teste, mediu-se o pico de torque isométrico de flexão do cotovelo, e o maior valor atingido nas três tentativas foi registrado. Os valores de pico de torque foram coletados em Newton/metro ($N \cdot m^{-1}$) e em % do pico.

Todos os exercícios que os participantes realizaram neste estudo foram conduzidos no Laboratório de Esforço Físico da Universidade

Federal de Santa Catarina, aplicados e supervisionados por Educadores Físicos.



Figura 15 – Imagem destacando o ângulo de 90° utilizado para obter a contração voluntária máxima isométrica (pico de torque isométrico). Fonte: o autor.

6.6 COLETA SANGUÍNEA

As amostras de sangue foram coletadas por técnico de laboratório habilitado. A veia antecubital mediana foi puncionada pela inserção de agulha hipodérmica (25 x 7 mm), e o sangue (16 mL) foi coletado usando-se sistema a vácuo (Vacuntainer®) em dois tubos contendo heparina sódica e um tubo sem anticoagulante ou aditivos. O plasma e o soro foram obtidos imediatamente através de centrifugação do sangue (400g, 7 min) e congelados a -80 °C para a realização de análises posteriores.

6.6.1 Contagem de células sanguíneas

Amostras de sangue heparinizado (700 μ L) foram utilizadas para obtenção de leucograma em contador automatizado Advia 60 (Bayer HealthCare, Diagnostics). Com esse experimento, foram coletados dados para as contagens de células imunitárias presentes na circulação, tais como, leucócitos totais, neutrófilos, monócitos e linfócitos. A unidade de medida para essas células foi 10³ células/ μ L na contagem absoluta e % na contagem relativa.

6.6.2 Expressão de CD14, CD16, CD11b e p47^{phox} em leucócitos

As expressões da proteína CD14, CD16 e CD11b em membranas, e da proteína p47^{phox} no citoplasma de leucócitos sanguíneos foram determinadas por citometria de fluxo, conforme descrito por Peake et al (2005). Cem microlitros de sangue total foram hemolisados para obtenção de leucócitos que foram incubados com solução de fixação Cytotfix (BD-Biosciences). Após a fixação, as células foram incubadas com anticorpos IgG2 anti-human CD14 conjugado com Peridinin chlorophyll protein–Cyanine 5.5 (PerCP-Cy5.5), anti-human CD11b conjugado a alofococianina (APC), anti-human CD16 conjugado com R-Ficoeritina (PE) e IgG1 anti-p47^{phox} (Becton Dickinson © (BD), Franklin Lakes, NJ, USA) em presença de tampão de permeabilização Perm/Wash (BD-Biosciences). Posteriormente, as células foram lavadas em tampão de permeabilização e incubadas com anticorpos anti-IgG1 conjugado a Fluorescein isothiocyanate (FITC). Em passo seguinte as células foram lavadas em tampão de permeabilização. Após esse passo, as mesmas foram ressuspensas em solução salina e prosseguiram para leitura em citômetro de fluxo BD FACSCanto II. Os resultados foram expressos em proporção de células positivas e intensidade média de fluorescência (unidades arbitrárias).

A análise dos dados foi realizada por meio do software Flowing®, versão 2.5. Todas as marcações foram feitas pelo menos em duplicata e a fluorescência mediana foi anotada de cada amostra. Após a obtenção da fluorescência mediana, as médias foram calculadas e

subtraídas pelas médias das fluorescências sem o anticorpo (para descontar a fluorescência natural da célula).

6.6.3 Hidroperóxidos lipídicos

Os hidroperóxidos lipídicos presentes no plasma foram quantificados pelo método da oxidação do ferro com alaranjado de xilenol (FOX), conforme descrito por Nourroz-Zadeh, Tajaddini-Sarmadi e Wolff (1994). O princípio do método baseia-se na rápida oxidação do Fe^{+2} (ferroso) a Fe^{+3} (férico) em meio ácido, mediada pelos peróxidos lipídicos, conforme ilustrado na figura 17. O Fe^{+3} na presença de alaranjado de xilenol forma um complexo (Fe^{+3} -alaranjado de xilenol) que pode ser quantificado em 560 nm. Alíquotas de 50 μL de plasma foram centrifugadas por 5 minutos à 5000g com 200 μL de metanol. 18 μL do sobrenadante foi adicionado em uma placa de 96 poços juntamente com 2 μL de metanol (branco da amostra) ou 2 μL de trifenilfosfina (TPP) 10Mm (figura 14). A placa foi agitada e mantida em temperatura ambiente por 30 minutos.

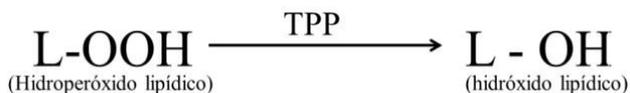


Figura 16 – representação esquemática da redução de LOOH pela trifenilfosfina (TPP). Fonte: o autor.

Após essa incubação foi adicionada em cada poço 180 μL de reagente de trabalho FOX, composto por alaranjado de xilenol 1,0mM e sulfato de ferro e amônio 2,5mM, preparados em H_2SO_4 (ácido sulfúrico) 250mM, e BHT 4,4mM. Os LOOH presentes na amostra oxidam os cátions ferrosos (Fe^{2+}) da solução de trabalho. A produção de Fe^{3+} será menor nas amostras tratadas com TPP, visto que nestas, todos os LOOH foram reduzidos.

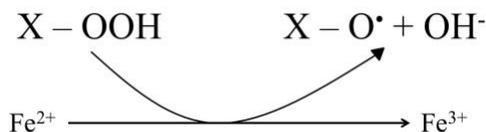


Figura 17 – representação esquemática da oxidação do Fe^{2+} por hidroperóxidos. Fonte: o autor.

As amostras foram incubadas por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente e lidas no espectrofotômetro em 560nm. A concentração de hidroperóxidos lipídicos foi calculada pela diferença entre as absorvâncias das amostras com metanol (branco) e com TPP. Para curva padrão foi utilizado uma diluição seriada com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo que o ponto mais alto da curva foi de $3,1\mu\text{mol/mL}$ com diluições sucessivas até o ponto zero. Os resultados são expressos em $\mu\text{mol/mL}$.

6.6.4 Carbonilação de proteínas

Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação de formação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH) como previamente descrito por Levine et al. (1990). Foram utilizados 2 microtubos para cada amostra contendo $100\mu\text{L}$ de plasma. Em 1microtubo foi adicionado $600\mu\text{L}$ de DNPH diluído em HCl 2M. No outro microtubo foi adicionado $600\mu\text{L}$ apenas de HCl.



Figura 18 – representação esquemática da reação promovida pela dinitrofenilhidrazina em grupos carbonil de proteínas presentes na amostra. Fonte: o autor

Após incubação de 1 hora no escuro com agitação a cada 10 minutos foram adicionados 600 μ L de ácido tricloracético 20% (TCA 20%) e centrifugado por 5 minutos, à 11000g, 4°C. Foram realizadas três lavagens com 800 μ L etanol-etilacetato (1:1) e centrifugação de 10 minutos à 15000g, 4°C. Após essas lavagens foi adicionado 900 μ L de ureia 8M dissolvida em tampão de KH_2PO_4 20mM (fosfato de potássio) com pH 2,3 e incubado em banho-maria por 30 minutos à 60°C com agitação no minuto 15. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 14000g, 4°C e lidas em 360nm em espectrofotômetro com temperatura ajustada em 37°C. Uma curva com concentrações de 2mg/mL no ponto mais concentrado e diluição até zero foi feita para normalização dos dados com BSA (albumina sérica bovina) e a solução de ureia 8M citada acima e lida em 280nm (Marca Molecular Devices, Modelo Spectramax® Paradigm, CA, USA). O conteúdo de formação de grupos carbonil foi determinado utilizando um coeficiente de 22.000 molar⁻¹. Os resultados foram expressos em nmol/mg.

6.6.5 Atividade da enzima creatina cinase total

A atividade da enzima indicadora de lesão tecidual creatina cinase total (CK) foi quantificada no soro dos indivíduos utilizando-se o sistema de reação Labtest® (Lagoa Santa/MG), através de método cinético, conforme as instruções do fabricante. O princípio do método baseia-se na medida dos produtos finais, creatina e ATP, formados na reação catalisada pela CK entre a creatina-fosfato e o ADP. O ATP produzido na primeira reação é, então, empregado em um ensaio enzimático acoplado de glicose utilizando-se as enzimas glicose hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase. A produção de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) na reação indicada foi monitorada em 340 nm (Marca Molecular Devices, Modelo Spectramax® Paradigm, CA, USA), a qual está relacionada à atividade da CK na amostra, sendo que a atividade da enzima será calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade (ϵ) do NADPH em 340 nm de $6,22 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Os resultados foram expressos em U/L.

6.6.6 Atividade da enzima aldolase

A atividade sérica da enzima aldolase foi determinada através de método cinético, usando o sistema de reação Randox® (Randox Laboratories, Reino Unido). A aldolase converte a frutose-1,6-difosfato em gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato. O princípio do método baseia-se na conversão de dihidroxiacetona a glicerol-1-fosfato, pela adição de triosefosfato isomerase, glicerolfosfato dehidrogenase e NADH (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide*). Em tubo de ensaio foram colocados 50µL de amostra, 250µL de Tampão, 12,5µL de NADPH e 2,5µL de GDH (Glicerolfosfato dehidrogenase)/TIM (Triosefosfato isomerase)/LDH (Lactato desidrogenase). Os reagentes foram homogeneizados e incubados por 5 minutos a 37°C. A absorbância A1 foi lida contra o branco. Após a primeira leitura, incubaram-se os tubos novamente a 37°C por 20 minutos. Foi lida a Absorbância A2. A taxa de reação da aldolase é medida pela diminuição da absorbância (A1-A2) a 340nm (Marca Molecular Devices, Modelo Spectramax® Paradigm, CA, USA), e como consequência a conversão de NADH a NAD⁺. Para calcular a atividade da aldolase multiplicou-se o resultado por 54,8 (fator determinado pelo fabricante). Os resultados foram expressos em U/L.

6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados na forma de média ± desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil dependendo do comportamento simétrico dos dados. Os dados foram submetidos a testes de normalidade. Foi utilizado o ANOVA para medidas repetidas ou o Friedman test, de acordo com a simetria dos dados. Para encontrar onde existiram diferenças utilizou-se o pós-teste de Bonferroni. O nível de significância adotado foi menor que 5% ($p < 0,05$). Para análise dos resultados desse projeto foi utilizado o pacote estatístico GraphPad Prism (San Diego, CA, USA), versão 5.0.

7 RESULTADOS

Nessa sessão serão apresentados os resultados pertencentes a esse estudo. Primeiramente será apresentado o fluxograma com o recrutamento, as perdas e desistências na amostra durante a execução desse projeto (figura 17). Depois disso, as características gerais dos sujeitos são apontadas de forma agrupada ($n=14$) e após a estratificação em função da recuperação da força no quarto (último) dia de observação do desenho experimental.

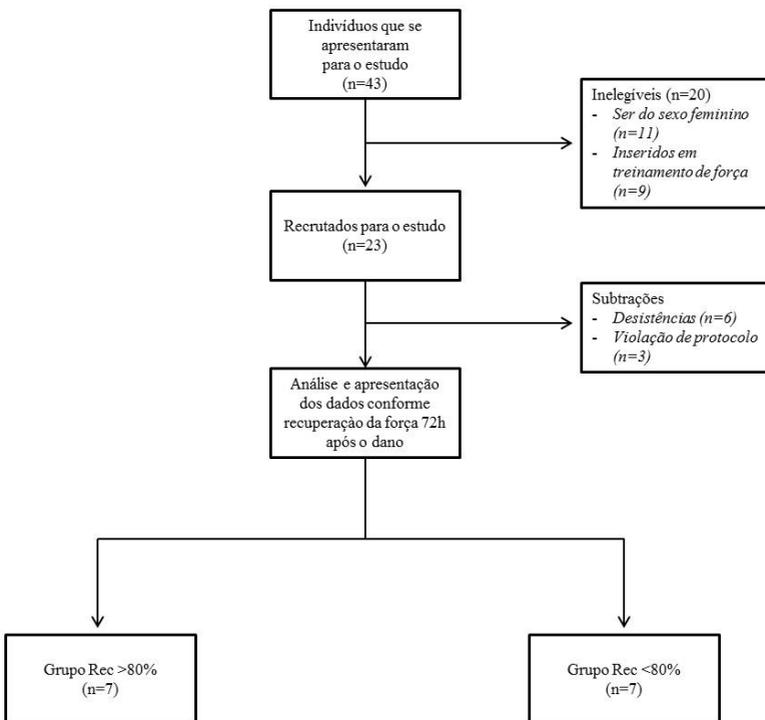


Figura 19 – Fluxograma detalhando os sujeitos recrutados para esse estudo, as perdas ocorridas e a divisão em dois grupos em função da recuperação da força três dias após o protocolo de dano muscular. Fonte: o autor.

7.1 CARACTERÍSTICAS DOS SUJEITOS

Na Tabela 1 constam os dados dos sujeitos participantes neste estudo. Estão apresentados os valores de cada dobra cutânea (DC) utilizada para o cálculo de estimativa da composição corporal proposto por Petroski (1995). Para os resultados de classificação do IPAQ – versão curta (do inglês *International Physical Activity Questionnaire*), validado por Matsudo et al. (2001), os dados são apresentados em minutos de atividade física/semana.

Tabela 1 - Dados de caracterização dos indivíduos participantes.

	Sujeitos (n=14)
Idade (anos)	24±3,6
Estatura (cm)	174±6,1
Massa (Kg)	72±10,8
IMC (Kg/m²)	23,7±2,7
DC tricipital[§]	10,1±3,3
DC Subescapular[§]	11,9±3,5
DC Supra Íliaca[§]	16,7±9,5
DC Gastrocnêmio[§]	9,5±4,6
% Gordura	15,3±4,5
IPAQ^{&}	485 [445-656]

Fonte: o autor. DC= dobra cutânea. IPAQ (do inglês *International Physical Activity Questionnaire*). Valores expressos em média ± desvio-padrão ou mediana [intervalo interquartil]. [§] Dados representados em mm. [&] Dados representados em minutos de atividades físicas/semana.

7.2 CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE FORÇA

Os valores de pico de torque estão apresentados na figura 20. A capacidade de produção de força teve comportamento distinto entre dois grupos de indivíduos, em ambos os grupos essa variável diminuiu significativamente após o protocolo de dano muscular e se mantiveram baixos 48 horas após o protocolo de dano. No entanto, no último dia (72h) um grupo (Rec >80%) apresentou significante recuperação da força (BASAL = 66,0±10,9 e 72h = 58,9±8,4), enquanto o outro grupo Grupo Rec <80%) não apresentou melhora nessa variável.

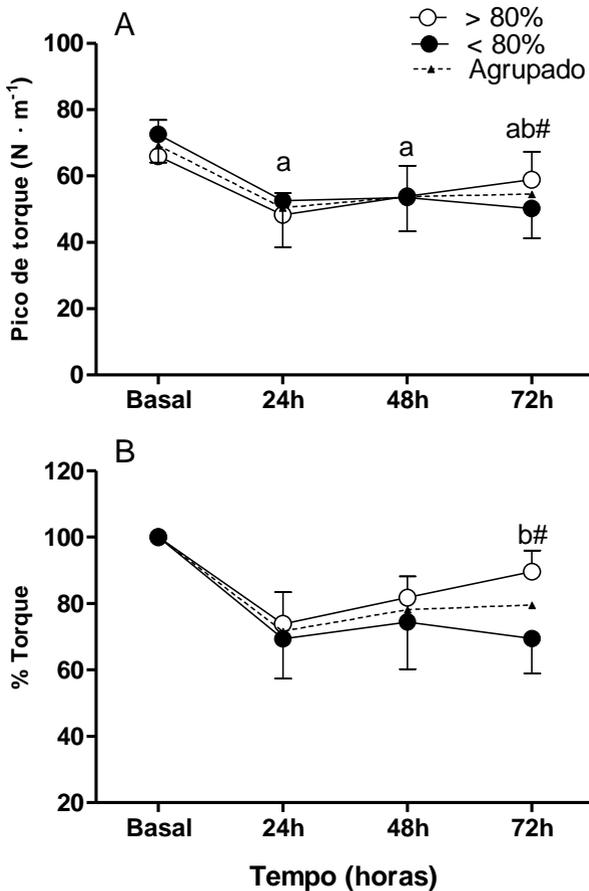


Figura 20 – Valores apresentados em média \pm desvio-padrão. Grupo Rec $>80\%$ representado com círculos brancos ($n=7$), Rec $<80\%$ representado em círculos pretos ($n=7$) e os valores dos indivíduos agrupados (linha tracejada, $n=14$). Em (A) o pico de torque (newton/metro) como medida para a capacidade voluntária máxima isométrica (CVMI). Em (B) os valores em %, assumindo que o basal de cada indivíduo como 100%. ^a = diferença para o basal ($p<0,05$); ^b = diferença para o 24h ($p<0,05$); # = diferença entre grupos ($p<0,001$).

7.3 ESTRATIFICAÇÃO DOS GRUPOS EM FUNÇÃO DA CAPACIDADE DE RECUPERAÇÃO DE FORÇA

Como a capacidade de recuperação da força, obtida por meio do pico de torque, tem sido considerada o melhor marcador indireto de dano muscular (PAULSEN, 2012; PROSKE, & MORGAN, 2001). Essa recuperação divergente entre duas populações em nossa amostra nos fez avaliar se haveria diferenças também em outras variáveis mensuradas, hipotetizando que essas poderiam ter relação com esse fenômeno distinto entre os dois grupos. Dessa forma, todas as variáveis apresentadas a seguir seguem essa estratificação dos dados em função da recuperação da força, com um grupo sendo denominado Rec >80%, que obteve recuperação maior que 80% 72 horas após o protocolo de dano, e outro grupo (Rec <80%) com recuperação abaixo desse valor no período observado.

7.3.1 Dados de caracterização dos sujeitos

Na Tabela 2 estão apresentados os dados de caracterização dos dois grupos utilizados nesse estudo. Nota-se que em nenhuma das variáveis mensuradas houve diferença estatística.

Tabela 2. Dados de caracterização dos indivíduos após estratificação dos grupos em função da capacidade de recuperação da força.

	Rec >80%	Rec <80%
Idade (anos)	22,7±3,1	25,3±3,7
Estatura (cm)	173,6±5,1	174,4±7,4
Massa (Kg)	71,4±7,0	73,1±14,1
IMC (Kg/m²)	23,7±1,8	23,9±3,5
DC tricipital[§]	10,8±3,3	9,4±3,4
DC Subescapular[§]	12,3±3,2	11,6±3,9
DC Supra Ilíaca[§]	15,2±6,4	18,3±12,1
DC Gastrocnêmio[§]	10,7±5,7	8,6±3,2
% Gordura	15,4±2,8	15,2±6,0
IPAQ^{&}	460[430-510]	620[460-675]

Fonte: o autor. Rec >80% = Grupo com recuperação maior que 80% 72 horas após o protocolo de dano. Rec <80% = Grupo com recuperação menor que 80% 72 horas após o protocolo de dano. DC= dobra cutânea. IPAQ= minutos/semana de atividades leves, moderadas e vigorosas. Valores expressos em média ± desvio-padrão ou mediana [intervalo interquartil]. [§] Dados representados em mm. & Dados representados em minutos de atividades físicas/semana. Não foram observadas diferenças entre os grupos (p>0,05).

7.3.2 Trabalho realizado no protocolo de dano

O trabalho em cada série e total foi mensurado e descrito na tabela 3, a unidade de medida é o Joule (J). Nessa tabela é possível observar que os dois grupos (Rec >80%; Rec <80%) tiveram redução significativa do trabalho realizado na segunda e na terceira séries quando comparadas a primeira série. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos em nenhuma das séries e nem no total de trabalho realizado (última linha).

Tabela 3. Trabalho realizado (J) no protocolo de dano.

	Rec >80%	Rec <80%
Série 1	958±262	1023±186
Série 2	821±307 ^a	828±150 ^a
Série 3	759±280 ^{aa}	739±139 ^{aa}
Total	2539±841	2591±434

Fonte: o autor. Rec >80% = Grupo com recuperação maior que 80% 72 horas após o protocolo de dano. Rec <80% = Grupo com recuperação menor que 80% 72 horas após o protocolo de dano. Trabalho medido em Joule (J) e expresso em média ± desvio-padrão. ^a = diferença comparada a série 1 (p<0,01). ^{aa} = diferença comparada a série 1 (p<0,001).

7.3.3 Decaimento na capacidade de produção de força imediatamente após o protocolo de dano

Ambos os grupos tiveram similar redução na capacidade de produção de força (figura 21) imediatamente após o protocolo de dano (p>0,05).

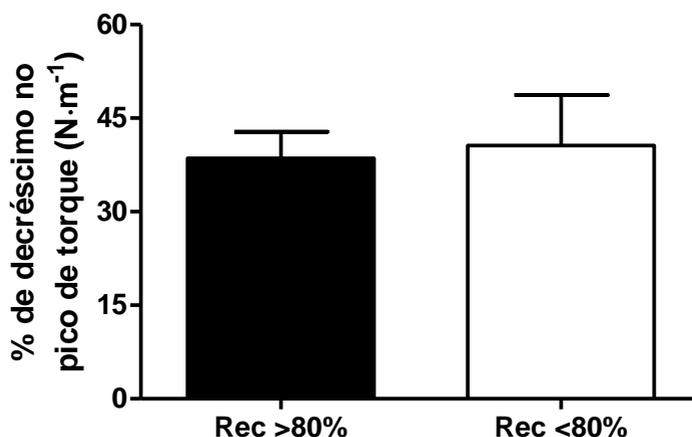


Figura 21 – Perda da capacidade de produção de força, em N·m⁻¹, imediatamente após a execução do protocolo de dano muscular. Rec >80% (n=7) e Rec <80% (n=7). Valores expressos em média ± desvio padrão.

7.3.4 Marcadores bioquímicos de dano muscular

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados dos marcadores indiretos de dano muscular. Quando lesionada, a membrana celular perde suas propriedades de controlar o fluxo de entrada e saída da célula, assim algumas enzimas do metabolismo energético podem ser extravasadas para a circulação. Dessa forma, a mensuração da atividade destas no soro pode servir como um marcador indireto de lesão celular. Nesse estudo, foram observadas atividades de duas enzimas citoplasmáticas encontradas no soro, a creatina cinase (CK) e a aldolase. Não houve diferença significativa no período observado em ambos os grupos e nem entre grupos ($p>0,05$).

Tabela 4 – Marcadores bioquímicos de dano muscular.

	Rec >80%				Rec <80%			
	Basal	24h	48h	72h	Basal	24h	48h	72h
Creatina cinase (U/L)	125 [110-178]	234 [131-554]	308 [199-2317]	561 [280-1282]	147 [103-246]	250 [103-1091]	197 [98-790]	1003 [125-2346]
Aldolase (U/L)	5,2 [3,0-8,9]	8,5 [4,5-10,2]	7,5 [4,4-10,3]	8,1 [2,0-10,8]	8,9 [7,8-11,3]	10,6 [8,9-17,3]	9,1 [8,3-20,8]	8,9 [3,7-10,8]

Valores expressos em mediana [intervalo interquartil]. Foi utilizado o Teste de Friedman com pós-teste de Dunn. Não houve diferença significativa nos tempos observados dentro do grupo e entre os grupos ($p>0,05$).

7.3.5 Contagem de células imunitárias

Na Tabela 5 estão apresentados os dados de contagens de células imunitárias no sangue total. Os dados absolutos para leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos estão na concentração de 10^3 células/ μ L de sangue. Nas últimas linhas da tabela é possível observar os valores em percentis. Sendo esse valor condizente com a sua contribuição na quantidade total de leucócitos. Os dados mostram que não houve diferença significativa na contagem absoluta e relativa de leucócitos totais, linfócitos e monócitos para ambos os grupos. No entanto, para a contagem relativa de neutrófilos, o grupo Rec <80% apresentou elevação na proporção desse tipo celular nos momentos 24h e 48h quando comparado ao basal ($p < 0,05$).

Tabela 5. Contagem de células imunitárias dos sujeitos nas quatro observações.

	Rec >80%				Rec <80%			
	Basal	24h	48h	72h	Basal	24h	48h	72h
Leucócitos totais[#]	3.8 [3.8-6.1]	4.5 [3.5-6.9]	4.5 [3.5-7.8]	5.7 [3.5-7.6]	5.5 [4.4-6.9]	5.5 [3.7-6.7]	4.6 [3.1-5.8]	4.7 3.0-6.2]
Linfócitos[#]	0.9 [0.4-1.2]	1.3 [0.6-2.4]	1.1 [0.8-1.6]	1.2 [0.5-2.7]	1.6 [0.5-2.1]	1.0 [0.3-1.4]	0.9 [0.5-1.4]	1.1 [0.3-1.3]
Neutrófilos[#]	2.7 [2.2-4.1]	2.7 [2.3-3.5]	3.8 [2.6-5.0]	3.4 [2.6-4.2]	3.1 [2.5-3.8]	3.2 [2.6-4.0]	3.0 [2.6-3.4]	2.6 [2.2-3.4]
Monócitos[#]	0.8 [0.5-1.1]	0.8 [0.7-1.2]	0.8 [0.5-0.9]	0.8 [0.5-1.0]	0.8 [0.5-0.9]	0.8 [0.6-0.9]	0.7 [0.5-1.1]	0.8 [0.5-1.3]
Linfócitos (%)	20 [16-22]	23 [17-34]	17 [8-22]	23 [15-35]	28 [15-40]	19 [11-21]	19 [13-20]	22 [10-24]
Neutrófilos (%)	62 [56-65]	56 [49-61]	67 [56-72]	59 [45-72]	58 [47-68]	64 [62-72] ^a	63 [60-70] ^a	63 [59-70]
Monócitos (%)	19 [15-22]	19 [15-20]	13 [11-20]	15 [12-16]	14 [11-18]	17 [15-18]	18 [14-20]	18 [16-19]

Fonte: o autor: Rec >80 e Rec <80%. Valores expressos em média \pm desvio-padrão ou mediana [intervalo interquartil]. [#] = concentração de 10^3 células/ μ L. ^a = diferença significativa quando comparada com o basal ($p < 0,05$).

7.3.6 Fenotipagem de monócitos

Foram realizados experimentos de citometria de fluxo para observar o fenótipo e prevalência de subtipos de células do sistema imunitário circulantes. A figura 22(A) descreve a % de células positivas para a proteína de membrana CD14, correspondendo assim a monócitos circulantes. Nota-se que a quantidade de células não foi estatisticamente diferente no decorrer do tempo observado em nenhum dos dois grupos (Grupo Rec >80% BASAL = $6,9 \pm 2,0$; 24h = $7,7 \pm 1,2$; 48h = $6,9 \pm 1,3$ e 72h = $7,2 \pm 1,4$, vs. Grupo Rec <80% BASAL = $5,1 \pm 1,8$; 24h = $5,4 \pm 2,5$; 48h = $5,9 \pm 1,6$ e 72h = $5,5 \pm 1,6$). Ainda, em nenhum momento houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

No gráfico abaixo (figura 22B), é possível observar a % de células que foram positivas apenas para o marcador CD14, ou seja, CD14⁺⁺CD16⁻. Esses monócitos, denominados clássicos não exibem positividade para a proteína CD16. Não foi observada diferença no decorrer dos dias em ambos os grupos (Grupo Rec >80% BASAL = $95,9 \pm 1,6$; 24h = $95,5 \pm 3,4$; 48h = $96,4 \pm 1,9$ e 72h = $95,7 \pm 3,1$, vs. Grupo Rec <80% BASAL = $90,2 \pm 5,4$; 24h = $92,0 \pm 3,8$; 48h = $93,7 \pm 2,5$ e 72h = $92,5 \pm 4,2$). No entanto, pôde-se observar diferença significativa entre os grupos no momento basal ($p < 0,05$).

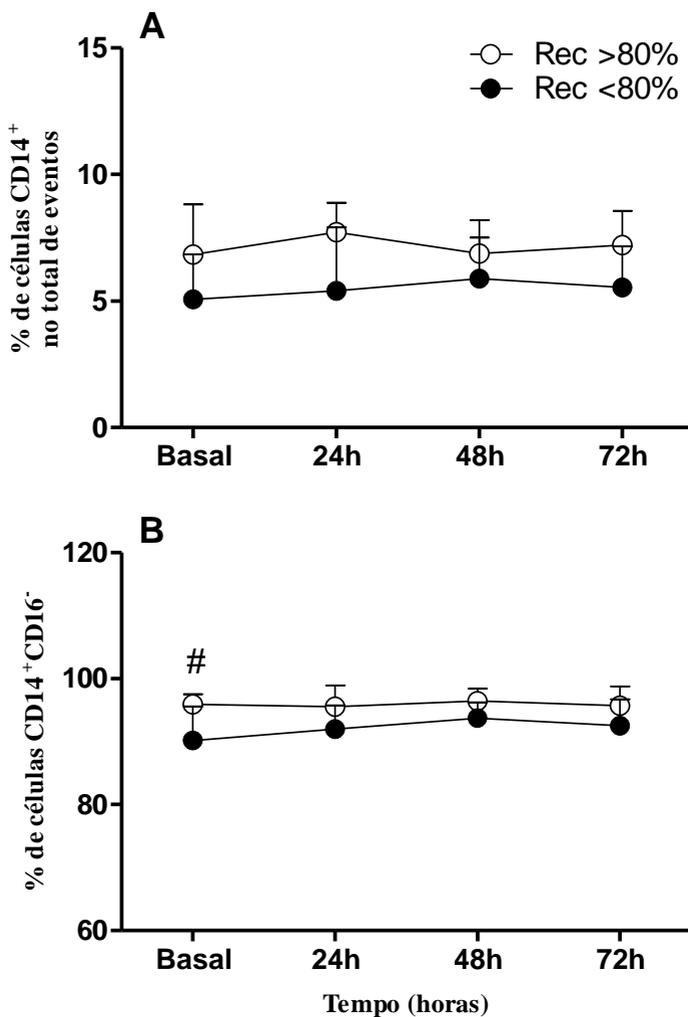


Figura 22 – Valores apresentados em média \pm desvio-padrão. Em (A) o % de células CD14⁺ no total de eventos lidos por citometria de fluxo (n=7 para cada grupo). No gráfico (B) a % de células CD14⁺/CD16⁻. # = diferença comparado ao momento basal (p<0,05).

Na figura 23 está apresentado o modelo de análise utilizado no *software* Flowing® para quantificar a expressão da proteína CD11b em membranas de células CD14⁺. Na figura 24(A) estão representados os valores de fluorescência (em unidades arbitrárias) da expressão da proteína de membrana CD11b em células CD14⁺ adquirido por meio da citometria de fluxo. No gráfico inferior (B) está demonstrada a variação da expressão dessa proteína nos intervalos indicados no eixo das abscissas. Foi realizada a ANOVA de duas vias para identificar as diferenças na expressão dessa proteína em função da recuperação da força e no decorrer do tempo observado. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. O tamanho amostral para esses resultados foi menor que para as outras análises, isso ocorreu devido ao término do anticorpo utilizado para marcar a proteína de membrana CD11b.

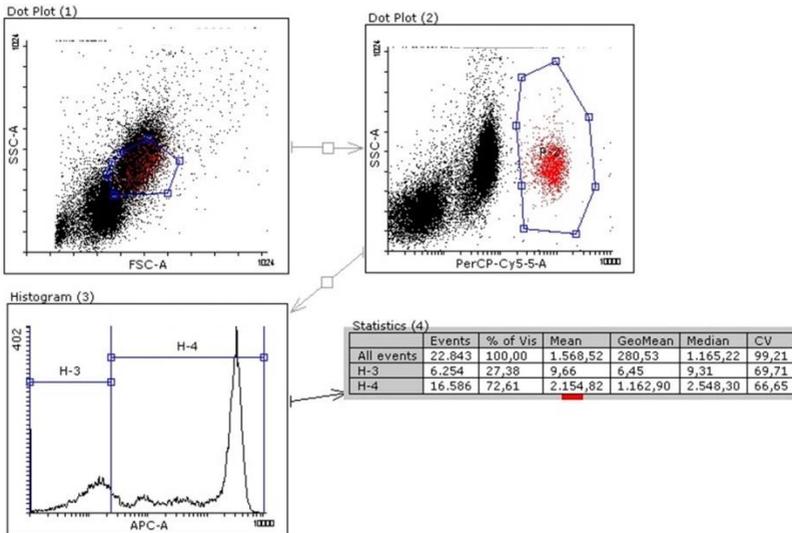


Figura 23 - Modelo de análise da CD11b em células CD14⁺. Fonte: o autor.

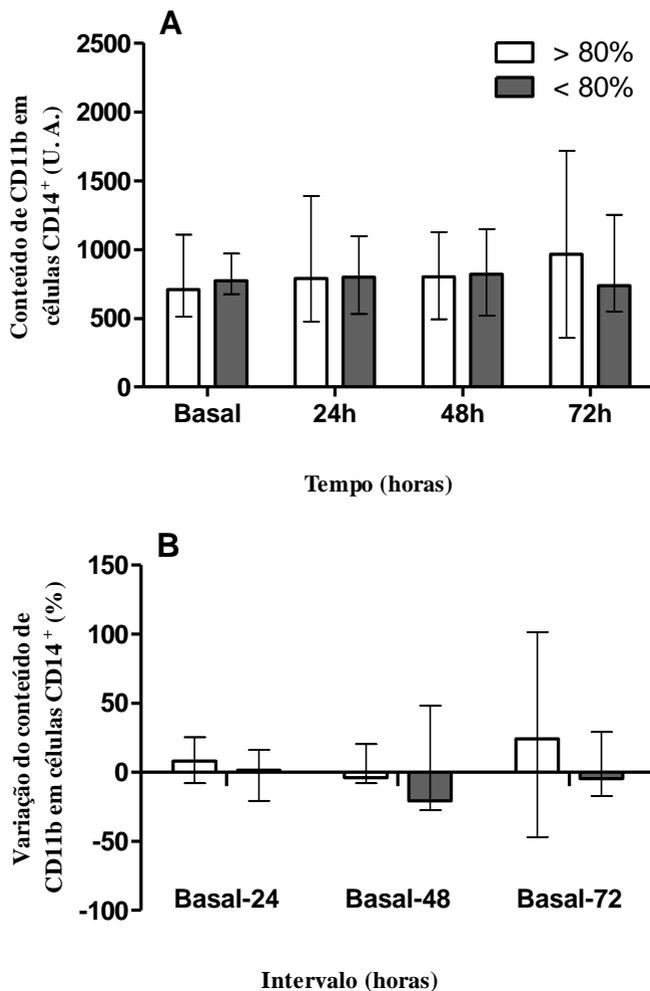


Figura 24 – U.A. = Unidades Arbitrárias. (A) Expressão de CD11b em células CD14⁺ apresentada em mediana e intervalo interquartil. (B) Variação em percentual na expressão de CD11b em células CD14⁺ comparado ao momento basal. Grupo Rec >80% (n=4); Grupo Rec <80% (n=5).

Na figura 25 está demonstrado o modelo de análise utilizado no *software* Flowing® para a quantificação da expressão da proteína p47^{phox} no citoplasma de células CD14⁺. Na figura 26(A) é possível observar que no grupo Rec >80% a expressão da p47^{phox} aumentou significativamente 24h após o dano ($p < 0,01$) retornando aos valores basais 48h após o dano (BASAL = $67,5 \pm 14,2$; 24h = $88,3 \pm 7,5$; 48h = $76,9 \pm 10,0$ e 72h = $76,0 \pm 10,7$). Já no grupo Rec <80% houve diferença na expressão dessa proteína nos momentos 48h e 72h quando comparados ao momento 24h ($p < 0,05$) (BASAL = $73,0 \pm 17,4$; 24h = $70,9 \pm 26,8$; 48h = $92,4 \pm 21,0$ e 72h = $91,6 \pm 27,1$). Quando observada a variação na expressão da p47^{phox} em células CD14⁺ gráfico inferior (B), pôde-se observar um comportamento antagonista entre os grupos nas primeiras 24 horas após o protocolo de dano. O grupo Rec >80% teve variação positiva (~50%) enquanto o grupo Rec <80% teve variação negativa (~20%), essa diferença foi estatisticamente significativa entre os grupos no intervalo basal-24h ($p < 0,05$). Também foi possível observar essa diferença no grupo Rec <80%, em que o intervalo basal-24h foi estatisticamente diferente ($p < 0,01$) dos outros intervalos (basal-48h e basal-72h).

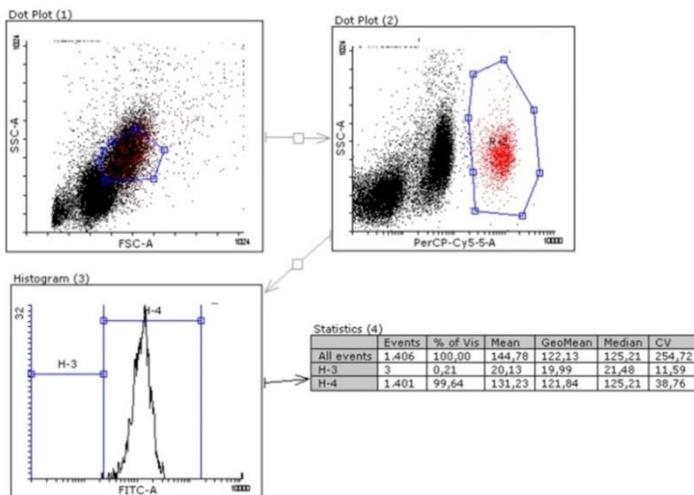


Figura 25 - Modelo de análise da p47^{phox} em células CD14⁺. Fonte: o autor.

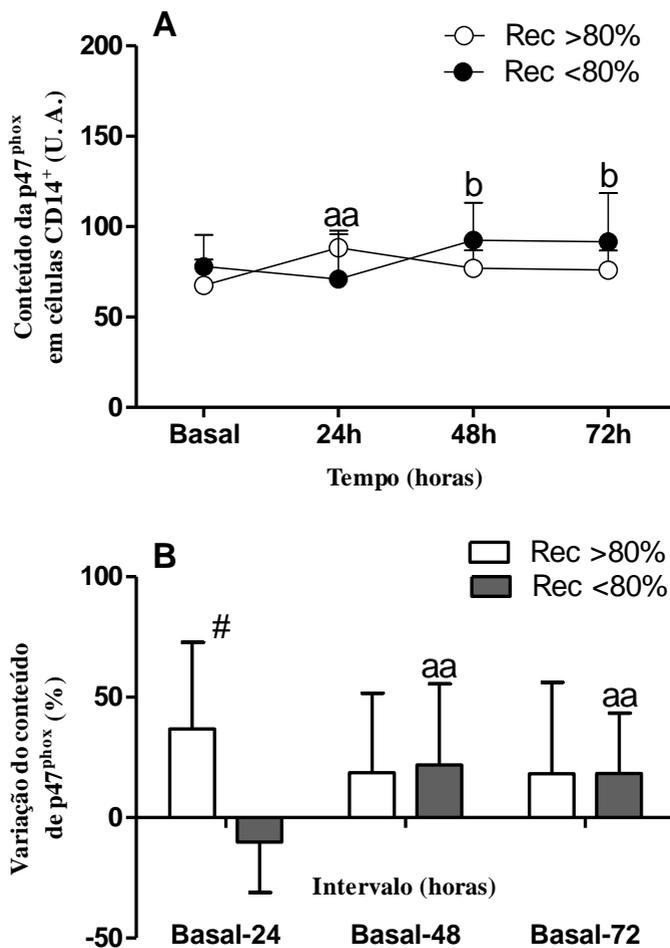


Figura 26 – (A) Expressão da proteína p47^{phox} em células CD14⁺. (B) Variação em percentual na expressão da p47^{phox} em células CD14⁺. Valores apresentados em média e desvio-padrão. ^{aa} = diferença quando comparado ao momento basal ($p < 0,01$). ^b = diferença quando comparado ao momento 24 horas ($p < 0,05$). [#] = diferença entre grupos no mesmo momento ($p < 0,05$) ($n = 7$ para ambos os grupos).

7.3.7 Produtos do estresse oxidativo

Foram analisados dois produtos do estresse oxidativo nos voluntários desse estudo e os mesmos estão apresentados na figura 27. Para as concentrações de proteínas carboniladas, apresentadas em nmol/mg de proteína, não houve diferença significativa entre os grupos e nos momentos observados (Grupo Rec >80% BASAL = 2,7[1,0-3,2]; 24h = 2,7[2,5-3,1]; 48h = 2,2[1,4-2,6] e 72h 2,4[1,5-3,3] vs. Grupo Rec <80% BASAL = 1,6[1,4-2,2]; 24h = 1,2[0,6-2,3]; 48h = 2,8[1,6-3,6] e 72h = 3,3[1,9-3,6].

No entanto, para as concentrações de hidroperóxidos lipídicos ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$), pôde-se observar um aumento nas concentrações deste marcador 48 horas quando comparado aos valores pré-exercício (Basal = 3,6[1,5-4,8] vs. 48h = 12,9[4,4-17,6]) no grupo Rec >80%. Já no grupo Rec <80% não houve diferença no período observado (BASAL = 2,3[1,5-2,9]; 24h = 2,9[2,3-3,8]; 48h = 2,7[2,5-4,6] e 72h = 2,9[1,8-4,6].

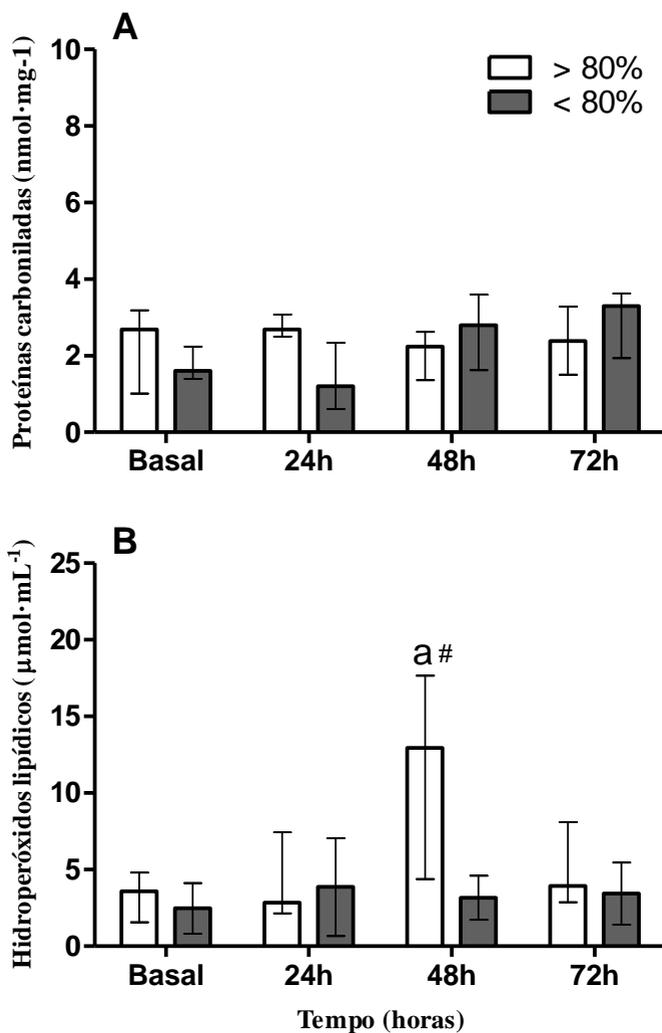


Figura 27 – Concentração de proteínas carboniladas (A) e hidroperóxidos lipídicos (B) no plasma. Dados apresentados em mediana e intervalo interquartil. ^a = diferença com o basal ($p < 0,05$); [#] = diferença entre os grupos no mesmo momento ($p < 0,05$).

8 DISCUSSÃO

Esse estudo se utilizou de indivíduos do sexo masculino, aparentemente saudáveis, adultos e fisicamente ativos, porém não inseridos em programas de treinamento sistematizados. A tabela 1 resume os dados característicos dos indivíduos. Pôde-se observar que não houve diferenças significativas entre os grupos quanto à idade, massa corporal, estatura, IMC e % de massa gorda. Essa similaridade entre os grupos proporciona maior confiabilidade para a análise das variáveis, reduzindo a chance de interferências por fatores ambientais, nutricionais, níveis de aptidão física, idade, entre outros.

A capacidade de produção de força tem sido apontada como o melhor marcador de dano ao músculo esquelético (BYRNE; TWIST; ESTON, 2004; PROSKE & MORGAN, 2001). Diante disso, foram realizadas mensurações da função muscular por meio da capacidade voluntária máxima isométrica, resultando no pico de torque produzido em um ângulo de 90° de flexão de cotovelo. Pôde-se observar que em ambos os grupos, houve uma diminuição significativa do pico de torque 24h após o protocolo de dano muscular (Figura 20). Essa redução na capacidade de produção de força manteve-se nos outros dias observados (48h e 72h) no grupo Rec <80%, no entanto, o grupo Rec >80% mostrou aumento significativo do pico de torque no último dia desse estudo (72h) quando comparado com os valores em 24h, mostrando que embora não houve recuperação total da força, houve melhora significativa quando comparada ao prejuízo em 24h. Esses resultados vão ao encontro dos achados por Jamurtas et al., (2005) que observaram significativo decréscimo no pico de torque isométrico após um protocolo de exercício excêntrico. No entanto, esses pesquisadores observaram as diferenças entre os danos causados no bíceps braquial e no quadríceps, sendo possível observar que o quadríceps recupera toda sua capacidade três dias após o protocolo estabelecido e o bíceps tem um atraso na recuperação. Nesse estudo os autores observaram por 96h após o dano muscular e não perceberam retorno à funcionalidade normal do bíceps braquial. Embora houvesse dois grupos em nosso estudo, um com recuperação >80% e outro com recuperação <80% no período de 72

horas após o dano, nossos achados corroboram os desses pesquisadores, com recuperação mais lenta desse grupamento muscular para esse tipo de dano.

Em revisão, Paulsen et al., (2012) sugerem que os resultados da capacidade de produção de força devem levar em consideração a magnitude do dano induzido pelo exercício (baixo, médio e alto dano) e a resposta dos indivíduos ao protocolo (do inglês, *high, medium and low responders*). Os mesmos autores em outro estudo (PAULSEN et al., 2010) usaram o pico de torque para identificar a magnitude do dano e a resposta dos indivíduos. Aparentemente, os participantes em nosso estudo seriam classificados como “*medium responders*”, com perda da capacidade de produção de força em torno de 40% (figura 21). Como foi observado redução no trabalho realizado de acordo com o número de séries executadas (Tabela 3), a perda na capacidade de produção de força imediatamente após o protocolo pode ter tido um componente metabólico, que contribuiu para esse decréscimo funcional. No entanto, a diminuição da função muscular se manteve por 24 e 48 horas após o dano, excluindo fatores metabólicos para o decréscimo na capacidade de produção de força (PAULSEN et al., 2012).

A princípio existem algumas razões para que o bíceps tenha uma recuperação mais lenta perante o dano induzido por ações excêntricas. A primeira delas é o seu uso no cotidiano, que colocaria o quadríceps numa condição de proteção a esse tipo de estímulo apenas pelo exercício de atividades diárias (andar em declive, descer escadas) (BROWN, 1997). O outro motivo é a arquitetura do músculo utilizado, o bíceps tem fibras dispostas em séries (fusiformes), essa disposição favorece a velocidade da contração em detrimento da produção de força. Já o quadríceps apresenta disposição das fibras formando ângulos em direção ao tendão (multipenadas), proporcionando maior eficiência na capacidade de produção de força em detrimento da velocidade da contração. Essas diferenças arquitetônicas sugerem que as fibras do bíceps são mais susceptíveis aos danos induzidos pelo exercício excêntrico do que as fibras do quadríceps (disposição multipenada) (FRIDEN; LIEBER, 2001). Outro ponto que pode ser relevante,

colocado por Proske e Morgan (2001), é a predominância de fibras musculares presentes no músculo exercitado, pois as fibras do tipo II (altamente presentes no bíceps braquial) seriam mais sensíveis aos danos induzidos por esse tipo de contração.

O aumento na contagem de leucócitos totais tem sido mostrado em diversos modelos de dano ao músculo esquelético por exercício excêntrico (KANANDA et al., 2013; MALM et al., 2004). No entanto, o protocolo de dano que foi utilizado neste estudo não foi capaz de promover alterações nas contagens dessas células (Tabela 5). Não houve também, variação na quantidade de linfócitos totais e relativos. Um estudo conduzido por Malm et al., (2004) encontrou alterações na contagem e proporção dos subtipos de linfócitos. Entretanto, em nosso estudo, não foram observados os subtipos dessa classe celular.

Os neutrófilos compõe o subtipo de leucócitos com maior predominância em humanos e há uma grande mobilização desse tipo celular para o músculo esquelético após o dano. Em modelo muito similar ao desse estudo, Pizza et al., (1996) encontraram aumento significativo na contagem de neutrófilos 48 horas após o protocolo de dano muscular. Quando esse mesmo grupo de indivíduos realizou novamente esse protocolo (2 semanas após o primeiro), foi possível observar que o primeiro teve aumento significativo na contagem de neutrófilos 6 e 24 horas após o dano quando comparado com o segundo protocolo de dano. Nossos resultados apontam aumento na contagem de neutrófilos apenas no grupo Rec <80%, o que dificulta a comparação com o estudo de Pizza et al., (1996), visto que ele não mensurou a capacidade de produção de força após o protocolo. O aumento na contagem de neutrófilos também foi visto em um estudo de Saxton et al., (2003). Nesse estudo, foram observadas as diferenças entre dois protocolos de dano, um com maior participação sistêmica e outro com menor, em ambos os protocolos foi observado incremento no número de neutrófilos. Em protocolo de 10 séries compostas de 40 repetições, Kanda et al., (2013) observaram neutrofilia, ou seja, aumento na contagem de neutrófilos circulantes 4 horas após o dano. Vale ressaltar que esses dois estudos supracitados utilizaram como músculo primário

para execução do protocolo o quadríceps, tendo em vista que esse músculo é consideravelmente maior em relação ao utilizado em nosso estudo (bíceps braquial), essa diferença de volume pode explicar as diferenças encontradas nas variações das contagens de neutrófilos.

O modelo de dano utilizado em nosso estudo não foi capaz de provocar alterações na contagem de monócitos. Esses resultados corroboram aos achados de por Pizza et al. (1996) e Saxton et al., (2003) que também não observaram alterações significativas nos monócitos circulantes após um protocolo de exercício excêntrico composto de 25 repetições para os flexores de cotovelo e 50 repetições para quadríceps, respectivamente.

Esses resultados divergentes na contagem de células podem ser explicados pelas diferenças entre protocolos, grupamento muscular utilizado ou quantidade de massa muscular recrutada durante o exercício (PEAKE; NOSAKA; SUZUKI, 2005). Outro ponto importante é que nem todos os estudos apontam a quantidade de trabalho realizada no protocolo de dano nem o comportamento do músculo nos dias que sucedem o exercício (i.e. capacidade de produção de força) o que torna a comparação entre resultados difícil. Além disso, deve-se considerar a alta taxa de variabilidade entre indivíduos, o que torna difícil a análise entre estudos principalmente com amostras pequenas. Em revisão, Paulsen et al., (2012) sugerem que as conclusões relativas a protocolos levem em consideração a magnitude do dano ao músculo induzido pelo exercício (baixo, médio e alto dano) e a resposta dos indivíduos ao protocolo (muito, médios e pouco sensíveis). No entanto, ainda não existem ferramentas para afirmar qual é a sensibilidade de um indivíduo ao protocolo de dano.

Em nosso estudo não foi possível observar variações nos marcadores bioquímicos de dano muscular nem em relação ao tempo e nem entre os grupos. Foram avaliadas atividades de duas enzimas no soro dos indivíduos, a creatina cinase (CK) e a aldolase. Nossos resultados vão de encontro aos achados por outros pesquisadores, que frequentemente têm encontrado aumento da atividade dessas enzimas

circulantes (KANDA et al., 2014; BLACKWELL et. al., 2015). As possíveis explicações para esses resultados contrários são as variações interpessoais, o músculo utilizado, estado de treinamento e protocolo adotado. No estudo conduzido por Kanda et al., (2014) o protocolo utilizado visou os membros inferiores, essa diferença pode ser a razão para os resultados conflitantes entre esse estudo e o nosso, possivelmente, devido ao tamanho do grupo muscular utilizado. Alterações na atividade da CK foram observadas por Blackwell et al., (2015), que utilizou um protocolo de dano para flexores de cotovelo e observou o pico de atividade da CK 4 dias após o dano. No entanto, o protocolo utilizado foi de 3 séries de ações excêntricas com carga de 80% de 1 repetição máxima até a exaustão. Esse protocolo pode ter causado maior dano ao bíceps que o utilizado em nosso estudo, podendo justificar o acréscimo na atividade dessa enzima no soro.

A citometria de fluxo tem sido utilizada em diversos estudos em pesquisa e na clínica. Essa técnica é eficiente no diagnóstico de certas doenças e seu uso na fenotipagem de células sanguíneas tem aumentado muito nas últimas décadas, com anticorpos cada vez mais específicos e sensíveis. Essa técnica foi utilizada nesse estudo para observar o fenótipo dos monócitos, que compõe um tipo de célula do sistema imunitário e que estão intimamente envolvidos no processo de reparo do tecido muscular (ARNOLD et al., 2007; CHAZAUD et al., 2003).

As células foram expostas ao marcador da proteína CD14, um receptor de lipopolissacarídeo que é altamente expressa em monócitos. Na figura 21(A) é possível observar a quantidade de eventos positivos para a proteína CD14 nas amostras lidas por citometria de fluxo, considerando o total de eventos como 100%. O grupo Rec >80% apresentou valores próximos de 10% do total de eventos em todos os dias do estudo, sem diferença entre os dias observados e que condizem com os valores encontrados na literatura para essa classe celular (YONA; JUNG, 2010). Na figura 21(B) é possível observar % de células CD14⁺⁺CD16⁻. O outro subtipo de monócito, CD14⁺CD16⁺ é menos abundante e foi considerado como a diferença entre os valores de CD14⁺⁺CD16⁻ e 100%. Esse tipo de célula foi classificado como

monócito inflamatório devido as suas características de secretar citocinas de perfil pró-inflamatório (Ex.: TNF- α) quando comparado aos monócitos clássicos (BELGE et al., 2002). Entretanto, essas potenciais atividades pró-inflamatórias desse subtipo celular têm sido postas à prova (WONG et al., 2012) o que torna a denominação como monócitos pró-inflamatórios equivocada. Nota-se que não houve diferença promovida pelo exercício na proporção de células CD14⁺⁺CD16⁻ nos dias observados em nenhum dos dois grupos. No entanto, o grupo Rec >80% teve maior proporção desse tipo de monócito no momento basal comparado ao grupo Rec <80%.

Em um estudo conduzido por Simpson et al., (2009), foi observado que após um protocolo de 45 minutos de corrida à 75% do VO_{2máx.} as proporções de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺ se alteraram, com diminuição dos monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ imediatamente após o exercício e incremento desse subtipo celular 1 hora após o exercício. O oposto foi observado nos monócitos CD14⁺CD16⁺, houve um acréscimo imediatamente após o exercício quando comparado com o valor basal seguido por diminuição 1 hora após. A razão de tal discrepância entre resultados é o modelo de exercício utilizado, já que uma atividade aeróbia de 45 minutos tem maior participação do sistema cardiovascular, redistribuição do fluxo sanguíneo, mobilização hormonal e energética, enquanto nosso estudo teve o objetivo de observar as variações nos subtipos de monócitos perante a um dano local. Outro ponto importante é a diferença nos períodos observados, enquanto puderam-se observar variações significativas imediatamente e após uma hora de exercício, nosso modelo avaliou as diferenças em dias, sendo assim, tais variações podem não ter sido vistas apenas por questões temporais e não porque não existiram.

A maior proporção de monócitos CD14⁺CD16⁺ no grupo Rec <80% no momento basal um dado interessante do nosso estudo. Uma maior proporção de monócitos não clássicos esteve atrelada a inatividade física em idosos (TIMMERMAN et al., 2008) e quando esses indivíduos foram expostos à treinamento aeróbio de 12 semanas, a

proporção de monócitos CD14⁺CD16⁺ diminuiu atingindo valores similares aos encontrados em idosos ativos. Utilizando-se de modelo animal, Arnold et al., (2007) demonstraram que monócitos não clássicos não infiltram no músculo após um dano induzido por toxina. Tendo em vista que os monócitos trocam seu fenótipo quando migram para o tecido, os monócitos clássicos trocariam de configuração fenotípica para macrófagos M1 (Pró-inflamatórios) que tem um potencial fagocítico e quimioatrativo maior do que os macrófagos M2 (Anti-inflamatórios), além de participar da ativação de células satélites quiescentes. Ainda segundo esse autor, o aumento de macrófagos M2 no tecido em reparo se dá em torno de 3-4 dias após o dano, sendo esse aumento devido à mudança de fenótipo dos macrófagos que já estão no local de reparo. A troca de fenótipo (de M1 para M2) parece ser dependente da condição do ambiente, ou seja, quanto mais cedo os debris celulares forem removidos, antes haverá a conversão de M1 para M2 (CHAZAUD et al., 2009). Evidentemente que os achados encontrados nos estudos supracitados não podem ser diretamente transpostos para humanos, pois o modelo de lesão é diferente assim como o *time course* do reparo nos animais. Considerando os achados dos modelos animais, nosso estudo aponta que o Grupo Rec <80% teve menos monócitos disponíveis para a infiltração no músculo após o dano, esse dado poderia explicar a razão pela qual esse grupo apresentou baixa capacidade de recuperação da força isométrica 72 horas após o dano induzido por exercício excêntrico. No entanto, estudos são necessários para averiguar qual o impacto fisiológico nessa diferença no *time course* do reparo do tecido muscular.

Na figura 22 estão os resultados da expressão da proteína de membrana CD11b em células CD14⁺. Nota-se que não houve alteração significativa na expressão dessa proteína. Na figura 22(B), estão os dados da variação da expressão em relação ao momento basal, em que também não foi observada diferença na expressão conforme os dias. Esses resultados vão de encontro aos achados de Pizza et al., (1996) que encontraram expressão aumentada de CD11b em monócitos 24 horas após um protocolo de dano ao bíceps braquial por exercício excêntrico. Outro estudo tem atentado para as diferenças na expressão de CD11b

em monócitos sob diferentes protocolos de exercícios, com maiores ou menores estresses sistêmicos (STEP e exercício excêntrico para quadríceps, respectivamente), verificou-se que a expressão de CD11b em monócitos não foi alterada em ambos os protocolos (SAXTON, 2003). Em revisão realizada por Peake, Nosaka e Suzuki (2005) é possível observar que a expressão de CD11b em monócitos pode aumentar em torno de 10-40% ou mesmo diminuir (30%) em modelos de dano por ações excêntricas.

O aumento da peroxidação lipídica 48 horas após o dano no grupo Rec >80% (figura 24B) é um indício que esse aumento na expressão da p47^{phox} conduziu uma maior atividade do complexo Nox. O complexo Nox é apontado como unidade fundamental para o *burst respiratório* nos monócitos, fator essencial na fagocitose desempenhada por essas células (EL-BENNA et al., 2009). Esses dois resultados, aumento da p47^{phox} e da peroxidação lipídica, contribuem para a afirmação que a geração de EROs esteve aumentada nesses indivíduos, o que poderia explicar o motivo pelo qual estes tiveram uma recuperação precoce da capacidade de geração de força do que o outro grupo. Segundo a literatura, as EROs oriundas do complexo Nox parecem bloquear a atividade da PTP (proteína tirosina fosfatase) que tem papel inibidor na RTK (receptor de tirosina cinase), que por sua vez, atua na ativação de diversas cascatas de sinalização, como a ERK1/2, p38/MAPK, JNK e PI3K (FU et al., 2014). Dessa forma, a atuação das EROs resulta na ativação desses eventos, com especial atenção para a ativação da p38/MAPK no processo de reparo do tecido muscular esquelético.

O processo de reparo muscular envolve a ativação de células satélites, essa ativação resulta em proliferação destas e podendo após esse evento, voltar ao estado quiescente ou se diferenciar em miócitos. Esses miócitos diferenciados farão o processo de fusão com miofibrilas existentes. A proliferação de células satélites deve ser controlada para que não seja insuficiente ou excessiva, proporcionando condições ideais para que os próximos eventos possam ocorrer de forma eficiente (BRIEN et al., 2013). Os sinais envolvidos na interrupção ou

continuação da proliferação das células satélites são mediados principalmente pela via da p38/MAPK. Existem quatro subtipos de p38 (p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ), sendo que as isoformas α e γ são as mais expressas no músculo esquelético (CUADRADO; NEBREDA, 2010). Em um estudo realizado por Brien et al., (2013) foi observado que ratos submetidos à injeção de cardiotoxina, *knock-out* para a p38 α , tiveram aumento no tempo de proliferação de células satélites e no *pool* dessas ao final do experimento (25 dias). A falta da p38 α não alterou a capacidade de reparo nem o tamanho das fibras no final do período observado, no entanto, esse prolongamento na proliferação de células satélites resultou em atraso na diferenciação das mesmas para miócitos, mostrando um *time course* diferenciado para esses animais.

Sabendo que as EROs podem atuar como segundos mensageiros ativando a via p38/MAPK, essa via mais ativada poderia supostamente atuar na regulação da proliferação de células satélites e conduzindo então, à diferenciação destas, devolvendo precocemente a funcionalidade desse tecido de uma maneira tempo-dependente. Outro dado que suporta esse raciocínio foi sugerido por Tidball et al., (2014), em que coloca as EROs ativando, de forma autócrina, a via NF- κ B nos macrófagos infiltrados no músculo danificado, que culminará na produção e secreção de citocinas de perfil pró-inflamatório, como TNF- α , IL-1 β . Essas citocinas são conhecidas por ativar a via MAPK/p38, promovendo diferenciação e fusão dos miócitos recém-formados.

Vários estudos têm utilizado os danos às moléculas lipídicas para caracterizar um quadro de estresse oxidativo. Dentre os que utilizaram a determinação de hidroperóxidos lipídicos, os resultados têm se mostrados inconclusivos, com aumento ou sem nenhuma alteração nas concentrações desse intermediário da peroxidação lipídica (QUINDRY et al., 2011; PASCHALIS et al., 2007; CHILDS et al., 2001). Esses resultados podem ser divergentes pelo modelo de dano utilizado bem como pelo tamanho da amostra. No presente estudo, foi possível observar aumento nos hidroperóxidos lipídicos apenas no grupo Rec >80% no momento 48 horas. A possível explicação para esse fenômeno pode ser o aumento da expressão da p47^{phox} (proteína

reguladora do complexo Nox) nos monócitos no momento 24 horas, fazendo com que essas células tivessem maior eficiência na atividade fagocítica quando em contato com o músculo inflamado.

Nossos resultados de proteínas carboniladas vão de encontro aos encontrados por Silva et al., (2010) que observaram incremento nas concentrações deste marcador 4 dias após dano induzido por exercício excêntrico. No entanto, esses autores utilizaram em seu protocolo experimental o movimento excêntrico apenas segurando um halter. Desse modo, a velocidade e a amplitude do movimento podem não ter sido uniformes. Sendo que esses dois componentes são fatores determinantes para o grau de lesão nas propriedades contráteis do músculo (PROSKE & MORGAN, 2001), os dados observados ficam difíceis de serem comparados. Ainda, não foi observada a recuperação da força após o protocolo de dano e sabendo que a produção de EROs está atrelada a fase do reparo tecidual, também dificulta traçar um paralelo sobre as alterações plasmáticas e o seu reflexo com a situação intramuscular. A ausência de alteração nas concentrações de proteínas carboniladas pode ser explicada pelo método empregado. A mensuração de grupos carbonil presentes nas proteínas do plasma é inespecífica, podendo não representar os danos às proteínas contráteis do tecido muscular. As proteínas plasmáticas mais abundantes são a albumina e as imunoglobulinas (GRIFFITHS et al., 2014), dessa forma, eventuais danos às proteínas podem depender do grau do estado redox e das taxas de *clearance* dessas moléculas no organismo.

Em estudo realizado por Margaritelis et al., (2014) foi utilizado o exercício excêntrico para promover dano à musculatura do quadríceps. Foi observada redução da capacidade de produção de força 48 horas após o dano juntamente com aumento nas concentrações de proteínas carboniladas. Um dado interessante desse estudo foi o tamanho da amostra utilizada, que foi composta de 98 indivíduos. Os autores puderam observar que 13% dos participantes apresentaram redução das proteínas carboniladas enquanto que em 21% dos indivíduos não houve alterações. Esses dados são interessantes para mostrar a alta variabilidade das respostas nesses parâmetros de estresse oxidativo, em

que pelo tamanho da amostra em nosso estudo, a falta de alterações nas concentrações de proteínas carboniladas pode ser devido ao pequeno tamanho da amostra. A figura 28 mostra os principais resultados encontrados nesse trabalho de forma resumida.

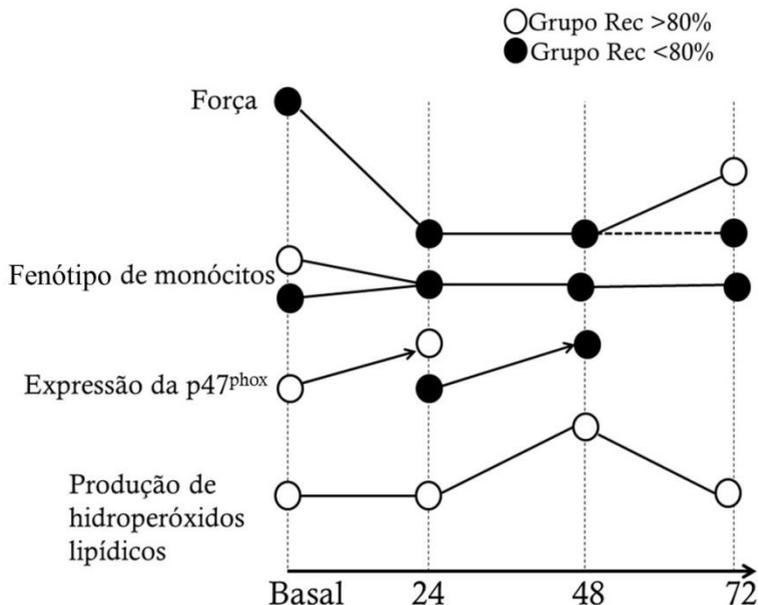


Figura 28 – resumo dos principais resultados encontrados nesse trabalho. Círculos brancos representam os indivíduos com recuperação maior que 80% da força no último dia de observação. Círculos pretos representam os indivíduos com recuperação menor que 80% da força no último dia de observação.

Algumas limitações desse estudo devem ser evidenciadas, como o pequeno número amostral. Alguns marcadores utilizados possuem grande variação individual, dessa forma, estudos com amostragens pequenas tornam os resultados inconclusivos devido a essas variações. Outra limitação relevante é a ausência de ferramentas diretas de avaliação acerca do músculo esquelético. Embora exista uma comunicação entre o tecido utilizado para o dano e a circulação

sistêmica, nem tudo o que é observado no sangue é reflexo direto do que está acontecendo dentro do músculo, deixando assim, as inferências dos mecanismos e eventos intramusculares puramente especulativos apoiando-se na literatura existente. Em relação às células circulantes do sistema imunitário, vale ressaltar que existem outros mecanismos que estão envolvidos na eficiência dessas células (i. e. diapedese, produção e secreção de citocinas, entre outros), e que não foram mensurados nesse estudo. Além dos outros tipos celulares, como neutrófilos e linfócitos, que também participam do processo de reparo do músculo esquelético.

9 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, é possível concluir que o protocolo utilizado nesse estudo promoveu dano ao bíceps braquial evidenciado pela redução na capacidade de produção voluntária de força. Contudo, outros marcadores indiretos de dano muscular não foram modificados significativamente, como a atividade das enzimas creatina cinase e aldolase. Além disso, a prevalência de monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ no momento basal e a atividade da Nox mostraram padrões distintos quando a capacidade de recuperação da força foi levada em consideração em nossos resultados. Outro resultado importante foi o aumento na expressão da p47^{phox} 24h após o basal no grupo Rec >80%, enquanto no grupo Rec <80% esse aumento foi relativamente tardio (48 e 72 horas), esses dados sugerem que a ordem temporal em que os eventos imunitários acontecem pode impactar na eficiência do reparo do tecido estudado.

10 PERSPECTIVAS

Para pesquisas futuras, restam algumas perguntas que esse trabalho não foi capaz de responder: (1) o que causa o aumento na expressão da p47^{phox} nos monócitos, (2) qual o impacto desse aumento dentro do tecido danificado durante o processo de reparo (i. e. capacidade fagocítica, produção de EROs, sinalização celular), (3) quais marcadores bioquímicos de dano muscular fornecem uma correlação confiável acerca da magnitude do dano e do estágio de reparo do tecido.

REFERÊNCIAS

- ANZAI, K. et al. Oxidative modification of ion channel activity of ryanodine receptor. **Antioxid Redox Signal**, 2:35–40, 2000.
- ARGUELLES, S. et al. Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? **Biochim et Biophys Acta**, v. 1674, n. 3, p. 251–259, 2004.
- ARNOLD, L. et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 5, p. 1057-1069, 2007.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid pEROSxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid Med and Cel Long**, 2014.
- BARASH, I. A. et al. Rapid muscle-specific gene expression changes after a single bout of eccentric contractions in the mouse. **Am J Physiol Cell Physiol**, 286: C355–C364, 2004.
- BELGE, K. et al. The proinflammatory CD14(+) CD16(+) DR(++) monocytes are a major source of TNF. **J Of Immunol**, v. 168, n. 7, p. 3536-3542, 2002.
- BLACKWELL, J. et al. Changes in CEBPB expression in circulating leukocytes following eccentric elbow-flexion exercise. **J Physiol Sci**, 65:145-150, 2015.
- BRANCACCIO, P. LIPPI, G. MAFFULLI, N. Biochemical markers of muscular damage. **Clin Chem Lab Med**, 48(6), 2010.
- BRIEN, P. et al.. p38 α MAPK regulates adult muscle stem cell fate by restricting progenitor proliferation during postnatal growth and repair. **Stem Cells**, 31:1597-1610, 2013
- BROWN, S. J. et al. Indices of skeletal muscle damage and connective tissue breakdown following eccentric muscle contractions. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol** 75(4):369–374, 1997.

BYRNE, C., TWIST., C., & ESTON, R. Neuromuscular function after exercise induced muscle damage. **Sports Med**, 34, 49-69, 2004.

CAROSIO, S. et al. Impact of ageing on muscle cell regeneration. **Ageing Res Rev**, 10: 35–42, 2011

CHAZAUD, B. et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. **J of Cell Biol**, v. 163, n. 5, p. 1133-1143, 2003.

_____. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 37, n. 1, p. 18-22, 2009.

CHEN, Z. et al. MAP kinases. **Chem Rev**101, 2449–2476, 2001.

CHILDS, A. et al. Supplementation with vitamin C and N-acetylcysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n.6, p.745-753, 2001.

CUADRADO, A. NEBREDA, A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. **Biochem J**, 429:403–417, 2010

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin Chim Acta**, 329: 23-38, 2003.

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

EL-BENNA, J. et al. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/ NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. **Exp. Mol. Med.**, v. 41, n. 4, p. 217-225, 2009.

FAUST, L. R. P. et al. The phosphorylation targets of p47 phox , a subunit of the respiratory burst oxidase: Functions of the individual target serines as evaluated by site- directed mutagenesis. **J of Clinic Invest**, v. 96, n. 3, p. 1499-1505, 1995.

FEASSON, L. et al. Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 543, n. 1, p. 297-306, 2002.

FRIDEN, J. LIEBER, R. L. Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fiber components. **Acta Physiol Scand** 171:321–326, 2001.

FU, X.-J. et al. NADPH oxidase 1 and its derived reactive oxygen species mediated tissue injury and repair. **Oxid Med and Cell Longevity**, v. 2014, 2014.

GARDINER, G. J. et al. A role for NADPH oxidase in antigen presentation. **Front Immunol**. 23;4:295, 2013.

GRIFFITHS, H. R. et al., Redox Regulation of protein damage in plasma. **Redox Biology**, 430-435, 2014.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr Rev**, 52:253–265, 1994.

HALLIWELL, B; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **Am J Clin Nutr**, 57, 715-725, 1993.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford Univ Press**, 2007.

ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From monocytes to M1/ M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. **Front in Immunol**, v. 5, 2014.

JACKSON, M. J. et al. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. **Mol Aspects Med**; 23:209–285, 2002.

JAMURTAS, A. Z. et al. Comparison between leg and arm eccentric exercises of the same relative intensity on indices of muscle damage. **Eur J Appl Physiol**, 95:179-185, 2005.

JIANG, F.; ZHANG, Y.; DUSTING, G. J. NADPH oxidase- mediated redox signaling: Roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. **Pharmacol Rev**, v. 63, n. 1, p. 218-242, 2011.

KANDA, K. et al. Evaluation of sérum leaking enzymes and a investigation into new biomarkers for exercise-induced muscle damage. **Exer Immunol Rev**. 20, p. 39-53, 2014.

_____. Eccentric exercise-induced delayed-onset muscle soreness and changes in markers of muscle damage and inflammation. **Exer Immunol Rev**. v. 19, p. 72-82, 2013.

KHARRAZ, Y. et al. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. **Mediat of Inflamm**, 1-9, 2013.

KOCK, A. J. PEREIRA, R. MACHADO, M. The creatine kinase response to resistance exercise. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, 14(1): 68-77, 2014.

LANDER, H. M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. **FASEB J**; 11:118–124, 1997.

LAURIZTEN, F. et al. Gross ultrastructural changes and necrotic fiber segments in elbow flexor muscles after maximal voluntary eccentric action in humans. **J Appl Physiol** 107: 1923-1934, 2009.

LEE, H. W. et al. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. **Biochim et biophys Acta**. 1835, p. 170-179, 2013.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, 186:464-78, 1990.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007.

LOMAX, K. et al. Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous-disease. **Science**, v. 245, n. 4916, p. 409-412, 1989.

LU, H. et al. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. **The FASEB J.** 25, 3344-3355, 2011.

LUO, B. CARMAN, C. V. SPRINGER, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. **Annu Rev Immunol.** 25:619-649, 2007.

MALM, C. et al. Leukocytes, cytokines, growth factors and hormones in human skeletal muscle and blood after uphill or downhill running. **J of Physiol**, v. 556, n. 3, p. 983-1000, 2004.

MARGARITELIS, N. V. et al. Redutive stress after exercise: The issue of redox individuality. **Redox Biol**, 2:520-528, 2014.

MARTINEZ, C. O. et al. Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2- activating chemokines is directly related to macrophage recruitment. **Am J of Physiol - Reg Int and Comp Physiol**, v. 299, n. 3, p. 832-842, 2010.

MATSUDO, S. et al. Questionário internacional de atividade física(IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. **Rev Bras Ativ Fis Saúde**, v. 6, n. 2, 05-18, 2001.

MERCHANT, S. H. GURULE, D. M. LARSON, R. S. Amelioration of ischemia-reperfusion injury with cyclic peptide blockade of ICAM-1. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 284:1260 –1268, 2003.

MULLER, W. A. Getting leukocytes to the site of inflammation. **Vet Pathol.** 50(1): 7-22, 2013.

NEWHAM, D. J. et al. Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. **J of the Neurol Sci**, v. 61, n. 1, p. 109-122, 1983.

NOUROOZ-ZADEH, J; TAJADDINI-SARMADI, J; WOLFF, S. P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Anal Biochem**, 1;220(2):403-9, 1994.

OKUTSU, M. et al. The effects of acute exercise- induced cortisol on CCR2 expression on human monocytes. **Brain Behav. Immun.**, v. 22, n. 7, p. 1066-1071, 2008.

PAULSEN, G. et al. Delayed leukocytosis and cytokine response to high- force eccentric exercise. **Med and Sci in Sports and Exer**, v. 37, n. 11, p. 1877, 2005.

PAULSEN, G. et a. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? **Exer Immunol Rev**, v. 18, p. 42-97, 2012.

PASCHALIS, V. et al. Uniform and prolonged changes in blood oxidative stress after muscle-damaging exercise. **In vivo**, 21:877-884, 2007.

PEAKE, J; NOSAKA, K; SUZUKI, K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. **Exer Immunol Rev**, 11, 64-85, 2005.

PELOSI, L. et al. Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. **FASEB J**. 21, 1393-1402, 2007.

PILLON, N. et al. Cross- talk between skeletal muscle and immune cells: muscle- derived mediators and metabolic implications. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 304: 453-465, 2013.

PIZZA, F. X. et al. Adaptation to eccentric exercise: effect on CD64 and CD11b/CD18 expression. **J Appl Physiol**, 80:47-55, 1996.

PLANT, D. R. LYNCH, G. S. WILLIAMS, D. A. Hydrogen peroxide modulates Ca^{2+} -activation of single permeabilized fibres from fast- and slow-twitch skeletal muscles of rats. **J Muscle Res Cell Motil**, 21:747–752, 2000.

POWERS, S. K. et al. Reactive oxygen species are signaling molecules for skeletal muscle adaptation. **Exp. Physiol**. 95.1 p1-9, 2009.

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

PROSKE, U; MORGAN, D. L. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. **J of Physiol**, 537.2, p. 333-345, 2001.

QUINDRY, J. et al. Muscle-fiber type and blood oxidative stress after eccentric exercise. **Inter J of Sport Nut and Exer Met**, 21:462-470, 2011.

REID, M. B. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. **J Appl Physiol**, 90:724-731, 2001.

REID, M. B. KHAWLI, F. A. MOODY, M. R. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. **J Appl Physiol**, 75:1081-1087, 1993.

RIGAMONTI, E. et al. Macrophage plasticity in skeletal muscle repair. **Biomed Research Inter**, 2014.

SACLIER, M. et al. Monocyte/ macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. **FEBS J**, 2013.

SAXTON, J. M. Peripheral blood leucocyte functional responses to acute eccentric exercise in humans are influenced by systemic stress, but not by exercise-induced muscle damage. **Clinic Science**, 104, 69-77 2003.

SERBINA, N. V. et al. Monocyte- mediated defense against microbial pathogens. **Annual Review of Immunol**, v. 26, p. 421-452, 2008.

SHANTSILA, E. et al. The effects of exercise and diurnal variation on monocyte subsets and monocyte- platelet aggregates. **Eur J of Clinic Invest**, v. 42, n. 8, p. 832-839, 2012.

SILVA, L. A. et al. Vitamin E supplementation decreases muscular and oxidative damage but not inflammatory response induced by eccentric contraction. **J Physiol Sci** 60:51-57, 2010.

SIMPSON, R. J. et al. Toll-like receptor expression on classic and pro-inflammatory blood monocytes after acute exercise in humans. **Brain, Behav, and Immun**, v. 23, p.232-239, 2009.

SMITH, M. A. REID, M. B. Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle. **Respir Physiol Neurobiol**, 151:229–241, 2006.

THIRUMALAI, T. et al. Intense and exhaustive exercise induce oxidative stress in skeletal muscle. **Asian Pac J Trop Dis**, 63-66, 2011.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 288: 345-353, 2005.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am J of Physiol - Reg Int and Comp Physiol**, v. 298, n. 5, p. 1173-1187, 2010.

TIMMERMAN, K. L. Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14⁺CD16⁺) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? **J Leuk Biol**, v. 84, 1271-1287, 2008.

WARREN, G. L. et al. Excitation- Contraction Uncoupling: Major Role in Contraction- Induced Muscle Injury. **Exer and Sport Scien Rev**, v. 29, n. 2, p. 82-87, 2001.

WONG, K. L. et al. The three human monocyte subset: implication for health and disease. **Immunol Res**, v. 53:41-57, 2012.

XIA, R. et al. Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide. **Am J Physiol Cell Physiol**, 285:215–221, 2003.

YAMADA, T. et al. Oxidation of myosin heavy chain and reduction in force production in hyperthyroid rat soleus. **J Appl Physiol**, 100:1520–1526, 2006.

YAMAMOTO, Y. Chemiluminescence-based highperformance liquid chromatography assay of lipid hydroperoxides. **Methods Enzymol.** v.233, p.319-324, 1994.

YIN, H. XU, L. PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. **Chem Rev**, vol. 111, no. 10, p. 5944–5972, 2011.

YONA, S.; JUNG, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. **Curr Opin Hematol**, v. 17, n. 1, p. 53-59, 2010.

YU, P. B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev.** 74(1):139-162, 1994.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. Blood monocytes and their subsets: established features and open questions. **Front Immunol** 6:423, 2015.

ZUO, L. et al. Biological and physiological role of reactive oxygen species—the good, the bad and the ugly. **Acta Physiol**,214,329–348, 2015.

APÊNDICES

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

CEP: 88040-970 – FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA

Participante n° __

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar como voluntário da pesquisa intitulada “**Avaliação do conteúdo da p47^{phox} e fenótipo de monócitos após dano muscular promovido por exercício excêntrico em indivíduos saudáveis**” de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Everson Araújo Nunes. Neste estudo, pretendemos avaliar quais são as alterações no perfil imunológico, principalmente monócitos, na recuperação da força muscular após o dano induzido por exercício excêntrico.

Esse estudo será constituído por quatro dias, sendo que no primeiro dia você realizará um protocolo de exercício excêntrico, utilizando um membro superior e um teste de força máxima. Nos outros dias apenas será realizado o teste de força máxima. Necessitaremos realizar uma coleta de 12 mL de sangue (3 tubos), em 4 momentos, em cada uma das fases: antes e 24, 48 e 72 h, após o exercício. Medidas de peso, estatura e dobras cutâneas serão efetuadas na semana anterior ao início do estudo. Você deverá manter os seus hábitos de atividade física e alimentação regulares durante o período do estudo; apenas solicitamos não ingerir bebidas alcoólicas. Além disso, precisamos que evite exercícios vigorosos nas 48 h precedentes à execução do protocolo de exercício excêntrico. Pedimos que, durante todo o estudo, não seja feito o uso de medicamentos ou de qualquer tipo de suplemento (ex.creatina, cafeína, micronutrientes etc.).

Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (n° 16832613.8.0000.0121) e trará o desconforto das coletas de sangue e da realização de exercícios intensos. Esta pesquisa não oferece riscos maiores que os citados acima, não tem fins lucrativos, é confidencial e o seu nome será usado apenas no primeiro momento de coleta das amostras de sangue. Em seguida, as amostras serão identificadas pelo número do seu cadastro. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas científicas, apresentados em congressos ou eventos científicos, sem que o seu nome seja mencionado em parte alguma. Sua participação é voluntária, podendo desistir desta pesquisa em qualquer de suas fases. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelos telefones 3721-2289; 9637-0237. Se você estiver de acordo em participar, garantimos que as informações obtidas e o material coletado serão confidenciais e só serão utilizados neste trabalho.

Eu, abaixo assinado, concordo em participar deste estudo.

Nome do participante

Assinatura Data:

Everson Araújo Nunes

Henver Simionato Brunetta

Coordenador – Fone 3721-2289

Pesquisador – Fone 9637-0237

e-mail: everson.nunes@ufsc.br

henver.brunetta@posgrad.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

CEP: 88040-970 – FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA

Participante n° ____

Eu, _____ declaro que li e compreendi as informações contidas nesse documento. Fui devidamente informado(a) pelos pesquisadores – Prof. Dr. Everson Araújo Nunes e Henver Simionato Brunetta - dos procedimentos que serão utilizados e da conduta deste estudo intitulado “Avaliação do conteúdo da p47^{phox} e fenótipo de monócitos após dano muscular promovido por exercício excêntrico em indivíduos saudáveis”, e concordo em participar da pesquisa como voluntário. Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Florianópolis, __ de _____ de ____ .

Assinatura do participante voluntário

R. G. _____

Prof. Dr. Everson Araújo Nunes

Professor Coordenador

Henver Simionato Brunetta

ANEXO I

QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA –
VERSÃO CURTA -

Nome: _____

Data: ____/____/____ Idade : ____ Sexo: F () M ()

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física você tem como parte do seu dia a dia. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na ÚLTIMA semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Por favor, responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação!

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas VIGOROSAS são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal.

- atividades físicas MODERADAS são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UMPOUCO mais forte que o normal.

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza por pelo menos 10 minutos contínuos de cada vez.

1a Em quantos dias da última semana você CAMINHOU por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

dias ____ por SEMANA () Nenhum

1b Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

2a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo, pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar **moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dias _____ por SEMANA () Nenhum

2b Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

3a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo, correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias _____ por SEMANA () Nenhum

3b Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentado durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

4a Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?

_____horas ____minutos

4b Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?

_____horas ____minutos

ANEXO II

CLASSIFICAÇÃO DO NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA – IPAQ

1. MUITO ATIVO: aquele que cumpriu as recomendações de:

a) VIGOROSA: ≥ 5 dias/sem e ≥ 30 minutos por sessão ou

b) VIGOROSA: ≥ 3 dias/sem e ≥ 20 minutos por sessão +MODERADA ou CAMINHADA: ≥ 5 dias/sem e ≥ 30 minutos por sessão.

2. ATIVO: aquele que cumpriu as recomendações de:

a) VIGOROSA: ≥ 3 dias/sem e ≥ 20 minutos por sessão; ou

b) MODERADA ou CAMINHADA: ≥ 5 dias/sem e ≥ 30 minutos por sessão; ou

c) Qualquer atividade somada: ≥ 5 dias/sem e ≥ 150 minutos/sem (caminhada + moderada+ vigorosa).

3. IRREGULARMENTE ATIVO: aquele que realiza atividade física, porém, de forma insuficiente para ser classificado como ativo, pois não cumpre as recomendações quanto à frequência ou duração. Para realizar essa classificação soma-se a frequência e a duração dos diferentes tipos de atividades (caminhada + moderada+ vigorosa).

4. SEDENTÁRIO: aquele que não realizou nenhuma atividade física por pelo menos 10 minutos contínuos durante a semana.

Sujeito	Caminhada		Moderada		Vigorosa		Classificação
	Freq.	Dur.	Freq.	Dur.	Freq.	Dur.	
1	4	20	1	30	-	-	Irregularmente ativo
2	3	20	3	20	1	30	Ativo
3	3	30	3	30	3	20	Muito ativo