



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LAÍS ROBERTA SÁBIO

**AVALIAÇÃO DE MODIFICAÇÕES
MÚSCULOESQUELÉTICAS AOS 60 E 180 DIAS APÓS
INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE ENFISEMA PULMONAR**

Londrina
2015

LAÍS ROBERTA SÁBIO

**AVALIAÇÃO DE MODIFICAÇÕES
MÚSCULOESQUELÉTICAS AOS 60 E 180 DIAS APÓS
INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE ENFISEMA PULMONAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier.

Londrina
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Sábio, Laís Roberta.

Avaliação de modificações músculoesqueléticas aos 60 e 180 dias após indução experimental de enfisema pulmonar / Laís Roberta Sábio. - Londrina, 2015.
72 f. : il.

Orientador: Flávia Alessandra Guarnier.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Enfisema pulmonar - Tese. 2. Papaína - Tese. 3. Músculo esquelético - Tese. 4. Estresse oxidativo - Tese. I. Guarnier, Flávia Alessandra. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

LAÍS ROBERTA SÁBIO

**AVALIAÇÃO DE MODIFICAÇÕES MÚSCULOESQUELÉTICAS AOS
60 E 180 DIAS APÓS INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE ENFISEMA
PULMONAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dra. Flávia Alessandra
Guarnier
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Priscila Cassolla
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Solange de Paula Ramos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 07 de agosto de 2015.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por guiar cada passo, cada conquista e proporcionar grandes oportunidades em minha vida.

A Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier, por aceitar me orientar e participar desse projeto, pela contribuição intelectual inestimável e disponibilidade de debater cada passo do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Rubens Cecchini, por compartilhar o espaço do seu laboratório e também por estar sempre disponível a tirar dúvidas contribuindo com seu vasto conhecimento nessa área.

Aos meus pais, Mariley e Carlos, por incondicionalmente apoiarem minhas escolhas, sempre proporcionando todo suporte necessário durante todo meu tempo de vida. Ao Luiggi, pelo amor e companheirismo em todos os momentos.

A Thamara N. X. Silva, que esteve comigo desde o início no desenvolvimento de cada etapa desse trabalho. Agradeço imensamente a sua participação não somente no trabalho, mas principalmente pela preciosa amizade, por cada conselho que, com certeza, faz diferença a cada dia. A Nichelle A. Vieira, que desde os primeiros dias no laboratório me ensinou a trabalhar com os animais e com todas as etapas da histologia que foram utilizadas no trabalho e por cada situação que compartilhamos.

Agradeço à Poliana Marinello, Kaliana Machado, Jean Kremer, Sidnei Dias. A presença de vocês, as conversas, trapalhadas, tornaram meu dia-a-dia muito mais feliz!

Aos técnicos do laboratório, Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho e Jesus Antônio Vargas por sempre estarem dispostos a ajudar na realização das técnicas. E pelos vários momentos de descontração.

As amigas de infância, Vivian Schuminski, Lana P. Veraldo, Karina Matavelli por entenderem os vários momentos de ausência devido à correria nesses últimos anos, e pelo suporte emocional extremamente necessário para os dias mais tensos.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.
(Albert Einstein)

SÁBIO, Laís Roberta. **Avaliação de modificações músculoesqueléticas aos 60 e 180 dias após indução experimental de enfisema pulmonar.** 2015. 73f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é grande causa de morbidade e atualmente considerada 3ª causa de morte a nível mundial. O desconforto dos indivíduos está relacionado principalmente com as manifestações sistêmicas, como perda de massa muscular e fadiga. A doença progride lentamente ao longo de anos. Vários estudos relatam que os músculos esqueléticos periféricos de pacientes com enfisema pulmonar apresentam níveis elevados de espécies reativas e que estas possuem papel sinalizador na adaptação muscular devido à mudança na estrutura de proteínas e estímulo de vias proteolíticas no tecido. Considerando que a DPOC progride lentamente e que a capacidade de adaptação do músculo esquelético é influenciada pelo tempo e intensidade a vários estímulos, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar manifestações músculoesqueléticas e a possível influência do estresse oxidativo (EO) sobre a oxidação de proteínas e adaptação do músculo esquelético aos 60 e 180 dias após a indução experimental de enfisema pulmonar. Hamsters *Syrian Golden* machos (n=8/grupo; 90-130g) foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: (1) controle-salina 60 dias (CS60); (2) controle salina 180 dias (CS180): instilação intratraqueal de 0,3 mL de NaCl 0,9%; (3) enfisema 60 dias (E60); enfisema 180 dias (E180): 1,25 UI de papaína em 0,3 mL de NaCl 0,9%. Após o tempo experimental, os animais foram pesados e eutanasiados para coleta do lobo médio do pulmão direito, o sangue e os músculos gastrocnêmios. O músculo foi pesado e utilizado para as análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas carboniladas (PC), glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), produtos provenientes da oxidação avançada de proteínas (AOPP), atividade citrato sintase e proteólise. O sangue foi utilizado para quantificar níveis de TNF- α e IL-1 β . O estabelecimento do enfisema pulmonar nos dois grupos instilados com papaína foi verificado por meio da diminuição significativa dos interceptos alveolares cruzados (IAC) em relação aos respectivos controles (C60: 69.18 \pm 1.64 e C180: 66.8 \pm 1.62; E60: 48.63 \pm 2.24 e E180: 48.23 \pm 1.40 IAC). Esses resultados demonstram que a doença não foi progressiva com o tempo. Apenas o grupo E180 apresentou diminuição significativa do peso final corporal e decréscimo significativo no peso do gastrocnêmio de 13,21% comparado ao CS180. Ainda, o índice de caquexia apresentado por E180 foi significativamente maior que o apresentado pelo grupo E60 (17.61 \pm 2.15% e 4.77 \pm 1.05% respectivamente). Quanto aos parâmetros de EO, E60 apresentou aumento significativo dos níveis de PC e diminuição significativa dos níveis de GSH e GSSG em relação a CS60. O grupo E180 apresentou recuperação dos níveis de GSH e redução dos níveis de PC quando comparado ao E60. A atividade proteossomal aumentou significativamente com o tempo no grupo C180 (C60: 49517 \pm 9879, e C180: 132466 \pm 17828 URL/mg proteína). As análises de TBARS, atividade da citrato sintase e AOPP não demonstraram diferenças significativas. Tendo em vista que neste modelo a doença não foi progressiva, esses resultados permitem concluir que o músculo esquelético

se adapta fortemente influenciado pelo tempo de exposição à doença, o que deve ser considerado em modelos de enfisema pulmonar induzido em animais.

Palavras-chave: Enfisema pulmonar. Papaína. Músculo esquelético. Estresse oxidativo.

SÁBIO, Laís Roberta. **Evaluation of musculoskeletal changes at 60 and 180 days after experimental induction of pulmonary emphysema.** 2015. 73f. Master Degree dissertation (Experimental Pathology) – Londrina State University, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Chronic obstructive pulmonary disease is a major cause of morbidity and it is considered third leading cause of death worldwide. The discomfort of individuals is related to the systemic manifestations such as loss of muscle mass and fatigue. The disease progresses slowly over years. Several studies have reported that the peripheral skeletal muscles of patients with emphysema have increased levels of reactive species and these species play an important role in signaling pathways in muscle adaptation by changing the structure of proteins and stimulation of proteolytic pathways in the tissue. Whereas COPD progresses slowly and skeletal muscle adaptation capability is influenced by the time and intensity to various stimuli, this study aimed to characterize musculoskeletal manifestations and the possible influence of oxidative stress (OS) on protein modification and adaptation of skeletal muscle at 60 and 180 days after experimental induction of emphysema by intratracheal instillation of papain. *Syrian Golden* hamsters (n=8; 90-130g) were randomized into four groups: (1) control-saline 60 days (CS60); (2) control-saline 180 days (CS180): intratracheal instillation of 0,3mL of NaCl 0.9%; (3) emphysema 60 days (E60); emphysema 180 days (E180): 1.25 IU of papain in 0,3mL NaCl 0.9%. After the experimental period, the animals were weighed and euthanized to collect middle lobe of the right lung, gastrocnemius muscles, and blood samples. Gastrocnemius was weighed and used for TBARS protein carbonyls (PC), reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), advanced oxidation protein products (AOPP), citrate synthase activity and proteolysis analysis. Blood samples were used to quantify TNF- α and IL-1 β . The establishment of pulmonary emphysema in both groups instilled with papain was confirmed. E60 and E180 groups had significantly lower CAI values (48.63 ± 2.24 and 48.23 ± 1.40 CAI, respectively) than the CS60 and CS180 (69.18 ± 1.64 and 66.8 ± 1.62 respectively). These results demonstrate that the disease was not progressive with time. Only E180 group showed a significant decrease in body weight and significant decrease 13.21% in gastrocnemius weight compared to CS180. Furthermore, cachexia index presented in E180 was significantly higher than the presented by the E60 group ($17.61 \pm 2.15\%$ and $4.77\% \pm 1.05\%$ respectively). Regarding to EO parameters, E60 showed a significant increase in PC levels and significantly reduced GSH and GSSG the levels compared with CS60. The E180 group showed a recovery of GSH levels and PC levels were decreased when it was compared to E60. Proteasome activity presented significant increase with time in C180 (C60: 49517 ± 9879 , and C180: 132466 ± 17828 URL/mg protein). TBARS, citrate synthase activity and AOPP analysis did not show significant differences. These data indicates that skeletal muscle adapts strongly influenced by the time of exposure to disease since the pulmonary injury does not progress. This is an important fact that should be considered in models of pulmonary emphysema induced in animals.

Key words: Emphysema. Papain. Skeletal muscle. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Enfisema centroacinar e pan-acinar.....	15
Figura 2 – A ativação de vias proteolíticas pelas espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético.	25
Figura 3 – Modificação oxidativa de proteínas.	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARE	Elemento de Resposta Antioxidante
AST	Área seccional transversa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EO	Estresse Oxidativo
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutathiona Reduzida
GSH-Px	Glutathiona Peroxidase
GSSG	Glutathiona Oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
Keap1	Proteína derivada de células eritróides tipo Kelch com homologia CNC - associadas à proteína 1
MDA	Malondialdeído
MuRF-1	Muscle Ring Finger Protein-1
NF-κB	Fator nuclear-kappa B
Nrf2	Fator nuclear Eritróide 2 - relativo ao fator 2
SOD	Superóxido Dismutase
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VEF1	Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo
α1-AT	alfa-1 Antitripsina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA.....	11
1.1.1	Epidemiologia	12
1.1.2	Enfisema Pulmonar	13
1.1.3	Manifestações Extrapulmonares no Enfisema Pulmonar	17
1.1.4	Perfil Oxidativo Muscular no Enfisema Pulmonar.....	19
1.1.5	Espécies Reativas nas Vias de Sinalização Celular.....	21
1.1.6	Modificação Oxidativa de Proteínas	23
2	JUSTIFICATIVA	29
3	HIPÓTESE	30
4	OBJETIVOS	31
4.1	OBJETIVO GERAL.....	31
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
6	ANEXO 1: ARTIGO	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

A denominação doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é definida como um estado de doença prevenível e tratável, caracterizado por limitação do fluxo aéreo, não totalmente reversível (CELLI; MACNEE; FORCE, 2004), com estreitamento das pequenas vias aéreas e destruição do parênquima pulmonar, associada à resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas ou gases nocivos (PAUWELS *et al.*, 2001; MACNEE, 2005; LARSSON, 2007).

A limitação crônica ao fluxo aéreo característica da DPOC é causada por uma associação da doença de vias aéreas centrais (bronquite), doença de pequenas vias aéreas (bronquiolite obstrutiva) e da destruição parenquimatosa (enfisema) sendo que a contribuição relativa de cada uma varia entre os indivíduos (RABE *et al.*, 2007).

A broncoconstrição, o aumento das células inflamatórias nas vias aéreas e produção de muco são considerados componentes reversíveis da obstrução ao fluxo aéreo. Em contrapartida, a destruição do parênquima pulmonar e o remodelamento das vias aéreas com aumento da colapsabilidade decorrente da destruição das fibras elásticas, constituem os componentes irreversíveis dessa obstrução (FLETCHER *et al.*, 1976; MACNEE, 2005).

Clinicamente os pacientes apresentam dificuldade respiratória, sobretudo na fase expiratória. A obstrução ao fluxo aéreo é geralmente progressiva, associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a fatores ambientais que também pode ser desencadeada por susceptibilidade genética (BRASILEIRO FILHO, 2012). Dentre os pacientes com DPOC, aproximadamente 20% apresentam enfisema pulmonar, enquanto os outros 80% possuem bronquite crônica ou, ainda, uma combinação destas duas doenças (DATASUS, 2004).

Entre os fatores de risco para a DPOC estão: o tabagismo, inclusive o fumo passivo; poluição (principalmente a partir da queima de combustíveis da biomassa, como em fornos siderúrgicos e fogão a lenha) (HU *et al.*, 2013), alérgenos

variados; agentes ocupacionais e estados pós-infecciosos (BRASILEIRO FILHO, 2012).

Como o tabagismo é o fator etiológico mais importante para o desenvolvimento tanto da bronquite crônica quanto do enfisema, muitos pacientes apresentam sobreposição das duas doenças, com predomínio ora do componente inflamatório das vias respiratórias (bronquite/bronquiolite), ora da destruição do parênquima pulmonar (enfisema). Na prática médica, estas duas entidades são agrupadas sob a denominação DPOC. A Bronquite determina estreitamento e obstrução da luz de pequenas vias respiratórias, com produção excessiva de muco pela árvore brônquica (HOGG, 2004), enquanto o enfisema é responsável por perda do recolhimento elástico pulmonar. A consequência funcional em ambas as doenças é a limitação progressiva ao fluxo aéreo devido ao aprisionamento de ar (“*air trapping*”), aumento da complacência dos pulmões e aumento da resistência ao fluxo aéreo em vias aéreas de pequeno calibre (BRASILEIRO FILHO, 2012; MACNEE, 2006; O'DONNELL; LAVENEZIANA, 2007).

1.1.1 Epidemiologia

A DPOC é considerada como grande causa de morbidade e mortalidade em nível mundial. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 80 milhões de pessoas sofrem de DPOC moderada ou grave. Esta doença é reconhecida como causa de aproximadamente 5,6% das mortes e atualmente constitui a terceira causa de morte no mundo, após infarto e doença isquêmica do coração (WORD HEALTH ORGANIZATION [WHO], 2014). De acordo com um estudo da *Global Burden of Disease*, a DPOC já foi considerada como causa de morte de, ao menos, 2,5 milhões de pessoas no mundo/ano (LOPEZ *et al.*, 2006).

No Brasil, detectou-se um aumento do número de óbitos por DPOC nos últimos 20 anos, em ambos os sexos, onde a taxa de mortalidade passou de 7,88 em cada 100.000 habitantes na década de 1980, para 19,04 em cada 100.000 habitantes na década de 1990, com um crescimento de 340%. A DPOC ocupa a 5ª posição em causa de morte e 290 mil pacientes são internados anualmente em decorrência desta doença (DATASUS, 2004). Em indivíduos acima de 40 anos, já foi estimada uma prevalência de DPOC em 18% nos homens e em 14% nas mulheres

na cidade de São Paulo (MENEZES *et al.*, 2005) e estima-se que 7 milhões (15,8%) possuam DPOC no Brasil. Porém o diagnóstico dessa doença é raro, apenas 2% desses indivíduos são diagnosticados com DPOC (MENEZES *et al.*, 2008). Nos Estados Unidos, de acordo com a Sociedade Americana de Pulmão (2011) foram estimados 12,7 milhões de adultos (18 anos ou mais) com DPOC. Além disso, como 24 milhões sofrem de função pulmonar diminuída, isso pode ser um sinal de que a DPOC possa ser frequentemente subdiagnosticada.

A DPOC e suas comorbidades estão associadas a um ônus econômico significativo, incluindo hospitalização, ausência no trabalho e incapacidades gerais (HUBER *et al.*, 2015; RABE *et al.*, 2007).

A prevalência, a morbidade e a mortalidade da DPOC variam entre os países, mas, em geral, está diretamente relacionada à prevalência do tabagismo, além de, em muitos países, a poluição do ar, resultante da queima de madeira e outros combustíveis de biomassa, também terem sido identificados como fator de risco da DPOC. Espera-se que a prevalência e o impacto desta doença aumentem nas próximas décadas devido à exposição contínua a fatores de risco da DPOC e da mudança da estrutura etária da população mundial em geral (RABE *et al.*, 2007). O aumento de mortalidade está relacionado à expansão epidêmica de fumantes e o aumento da expectativa de vida da população (LOPEZ *et al.*, 2006; MURRAY; LOPEZ, 1997).

1.1.2 Enfisema Pulmonar

O Enfisema Pulmonar é considerado uma DPOC caracterizada por aumento anormal e permanente do tamanho dos ácinos pulmonares, associado à destruição dos septos alveolares, sem fibrose evidente. De acordo com a distribuição anatômica das lesões, o enfisema pulmonar pode ser classificado em quatro tipos: parasseptal (acinar distal), irregular (paracicatricial), centroacinar (centrolobular) e pan-acinar (pan-lobular) (RUBIN *et al.*, 2006), sendo que os fumantes podem apresentar as duas últimas formas (KIM *et al.*, 1991). O enfisema pan-acinar é caracterizado por alta complacência pulmonar e baixa pressão de recolhimento elástico em altos volumes, sendo a limitação ao fluxo aéreo dependente desta perda da força de recolhimento (BRASILEIRO FILHO, 2012).

Essa classificação de enfisema é encontrada em pacientes portadores de deficiência de alfa-1 antitripsina (α 1-AT) e é o padrão de enfisema também verificado na reprodução experimental com o uso de enzimas proteolíticas, como papaína e elastase (SNIDER; LUCEY; STONE, 1986). As relações entre esses tipos de enfisema pulmonar e como cada tipo é formado ainda são desconhecidas (TAKAHASHI *et al.*, 2008). Algumas características distinguem o enfisema pan-acinar do centroacinar. No enfisema pan-acinar a doença é dominante na porção inferior do pulmão enquanto que a porção superior é mais afetada no centroacinar (THURLBECK, 1963); o nível de insuflação pulmonar é maior e há uma tendência das vias aéreas serem mais estreitadas no enfisema pan-acinar (MITCHELL *et al.*, 1970). Nesse tipo de enfisema também pode ser observado um alargamento difuso dos ácinos, estendendo-se desde a região hilar até a periferia dos pulmões, com perda das paredes alveolares e destruição de parte do leito capilar (KIM *et al.*, 1991; KUMAR *et al.*, 2008).

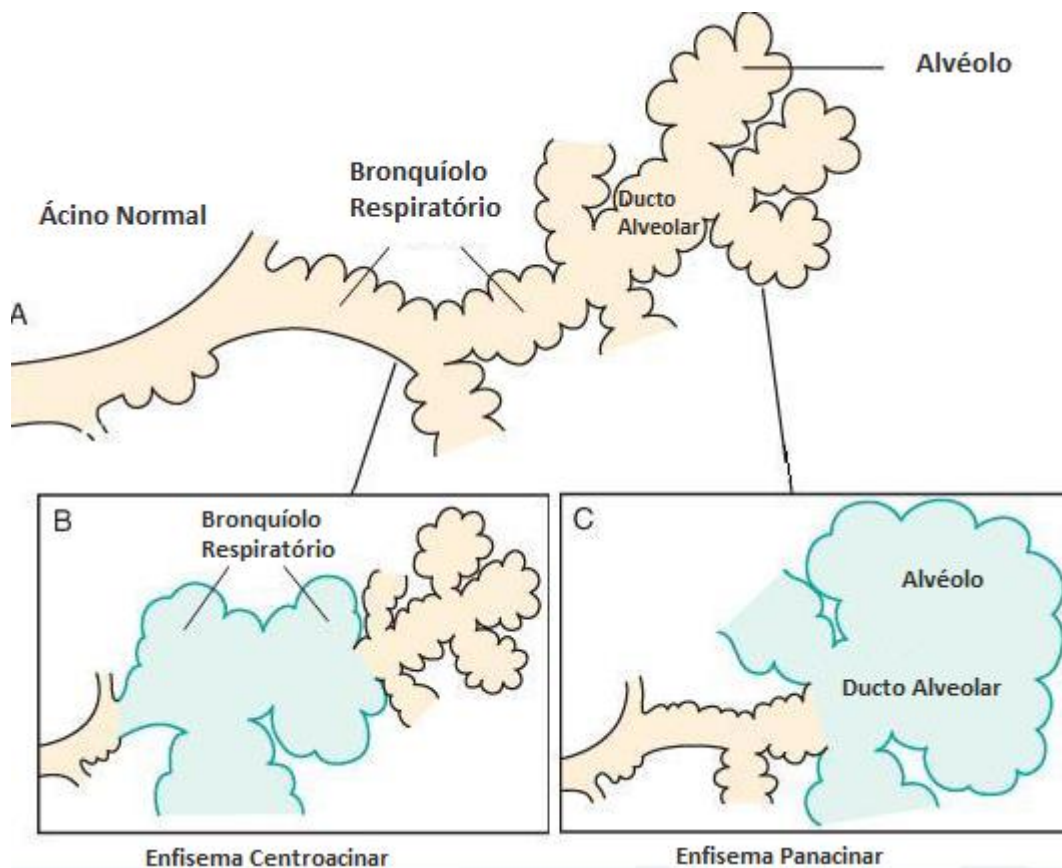


Figura 1: Enfisema centroacinar e pan-acinar.

(A) Estruturas normais do ácino pulmonar. (B) Enfisema centroacinar com dilatação dos bronquíolos respiratórios. (C) Enfisema pan-acinar com distensão dos ductos alveolares e alvéolos.

Fonte: KUMAR *et al* (2008)

A teoria mais aceita para a patogênese do enfisema é o mecanismo protease-antiprotease, segundo a qual o enfisema resulta de um desequilíbrio entre proteases e anti-proteases, com predomínio das proteases e consequente destruição dos septos alveolares (BRASILEIRO FILHO, 2012; SHARAFKHANEH; HANANIA; KIM, 2008). As principais fontes de enzimas proteolíticas no trato respiratório baixo são os neutrófilos e os macrófagos alveolares, ambos recrutados e ativados pelo processo inflamatório no pulmão de fumantes. Os neutrófilos liberam maior quantidade de serinoelastase no pulmão de fumantes, enquanto os macrófagos alveolares são considerados a principal fonte metaloelastases. A elastase neutrofílica quebra as fibras de elastina que normalmente contribuem para o recolhimento elástico durante a expiração (MACNEE, 2006). Em contrapartida, existem várias antiproteases no fluido que reveste o epitélio respiratório. A mais abundante é a α 1-AT, que possui a maior atividade antielastase no parênquima pulmonar. Por esta razão, deficiência de α 1-AT, por qualquer motivo, pode resultar em enfisema. A deficiência dessa enzima geralmente é causada por deficiência genética ou pelo aumento de agentes oxidantes no local (TRAVIS; SALVESEN, 1983)

O tabagismo tem papel relevante na gênese do enfisema, em parte relacionado com a ação da α 1-AT. Os principais mecanismos de ação da fumaça do cigarro no desenvolvimento do enfisema envolvem a atividade de células inflamatórias no pulmão e ação lesiva de agentes oxidantes. Ainda não está totalmente esclarecido o motivo pelo qual os pulmões de fumantes apresentam acúmulo de neutrófilos. Algumas possibilidades cogitadas são: (a) a nicotina promove a liberação de fatores quimiotáticos para neutrófilos, secretados por macrófagos; (b) como componentes da fumaça do cigarro depositam-se nas bifurcações da árvore respiratória, especialmente na origem dos bronquíolos respiratórios, ocorre um estímulo para reação inflamatória local; (c) e, ainda, esse componentes são capazes de alterar células endoteliais e neutrófilos diretamente ou podem promover aderência de neutrófilos ao endotélio capilar. A fumaça do cigarro ainda estimula a liberação de elastase pelos neutrófilos e aumenta a atividade proteolítica dos macrófagos (BRASILEIRO FILHO, 2012). Os fragmentos de elastina gerados por proteinases possuem efeito quimiotático nos monócitos e, então, aumentam a inflamação e a produção de protease no pulmão, criando uma

retroalimentação positiva que resulta em destruição contínua do parênquima (SENIOR; GRIFFIN; MECHAM, 1980).

Algumas citocinas produzidas no pulmão possuem envolvimento local na DPOC. Nesse sentido, já foram encontradas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na expectoração (VERNOOY *et al.*, 2002); interleucina 6 (IL-6) no lavado broncoalveolar e no ar exalado, ambas particularmente presentes durante exacerbação da doença (BHOWMIK *et al.*, 1999; BUCCHIONI *et al.*, 2003). Interleucina 12 (IL-12) na biópsia de brônquios de pacientes com DPOC (DI STEFANO *et al.*, 2004) também já foi encontrada.

Agentes oxidantes presentes na fumaça do cigarro, nas células inflamatórias e também na poluição ambiental também parecem ter papel importante na lesão tecidual pulmonar e no desenvolvimento do enfisema. Espécies reativas do oxigênio (ERO), além de agredirem diretamente os componentes da matriz extracelular, reduzem a eficiência do sistema antiprotease, por inibirem a ativação da α 1-AT. Sem a atividade desta, enzimas proteolíticas liberadas por qualquer motivo não são inativadas e atuam sobre os tecidos, causando destruição parenquimatosa (BRASILEIRO FILHO, 2012; MACNEE, 2006).

Por tudo isso, o enfisema parece resultar da interação de fatores constitucionais (deficiência de α 1-AT) e ambientais (sobretudo fumo) que atuam sinergicamente e levam à destruição tecidual característica da doença (FLETCHER; PETO, 1977; BRASILEIRO FILHO, 2012).

De maneira geral, três mecanismos são responsáveis pelas alterações funcionais na DPOC: estresse oxidativo, inflamação e o desequilíbrio do sistema protease-antiprotease. A contribuição relativa destes mecanismos é variável, explicando, possivelmente, as diferentes formas de apresentação da doença. (MAC NEE, 2005; SHARAFKHANEH *et al.*, 2008).

As repercussões fisiopatológicas do enfisema relacionam-se com alterações da função respiratória e da circulação pulmonar. A insuficiência respiratória é provocada pela redução do fluxo aéreo, sobretudo na expiração, devido à deformidade dos bronquíolos e à diminuição da elasticidade pulmonar causada pela perda do componente elástico dos septos alveolares; dificuldade de acesso ao ar inspirado às paredes alveolares, por aumento do ar residual; e redução da superfície de trocas gasosas por destruição dos septos alveolares com consequente redução do leito capilar (devido à destruição dos septos), podendo

estar associado à hipóxia, hipercapnia (BRASILEIRO FILHO, 2012) e também a um baixo pico de captação de oxigênio, que é considerado um expressivo sinal clínico de pacientes com DPOC (OGA *et al.*, 2007). Uma distribuição anormal das taxas de ventilação/perfusão devido às mudanças anatômicas encontradas no DPOC, é o principal mecanismo para essa troca gasosa anormal. A perda acentuada das paredes alveolares causa diminuição da capacidade de difusão pulmonar, reduzindo a função dos pulmões de oxigenar o sangue e remover o dióxido de carbono circulante. A perda de grande parte das paredes alveolares também diminui o número de capilares pulmonares pelos quais o sangue pode passar. Como resultado, a resistência vascular pulmonar aumenta acentuadamente, causando hipertensão pulmonar. Em consequência a esses fatores, ocorre alteração das proporções ventilação/perfusão, onde o processo obstrutivo é pior em algumas regiões do pulmão do que em outras, desta forma, algumas regiões são bem ventiladas e outras pouco ventiladas (BRASILEIRO FILHO, 2012).

Em geral, a transferência gasosa do oxigênio e do dióxido de carbono piora de acordo com a progressão da doença. Pode ocorrer retenção de gás carbônico quando este fato é associado à redução da ventilação devido ao aumento do custo energético da respiração, devido à obstrução severa e hiperinsuflação acoplada a disfunção da musculatura ventilatória (RODRIGUEZ-ROISIN *et al.*, 2009)

Em consequência a todos estes fatores, as principais manifestações clínicas do enfisema são dispneia, fadiga, intolerância ao exercício (DEGENS; VEERKAMP, 1994) e perda de peso (RUBIN *et al.*, 2006). Apesar de várias condições deletérias causadas pelo enfisema pulmonar, esta doença, em geral, progride lentamente ao longo de muitos anos (LOKKE *et al.*, 2006; SHAVELLE *et al.*, 2009). O indivíduo desenvolve hipóxia e hipercapnia em virtude da hipoventilação de muitos alvéolos associada a perda das paredes alveolares (BRASILEIRO FILHO, 2012).

1.1.3 Manifestações Extrapulmonares no Enfisema Pulmonar

Além das manifestações pulmonares, pacientes com DPOC apresentam intolerância ao exercício (SERRES *et al.*, 1998), que não está apenas relacionada à

função pulmonar reduzida, mas também à alteração na musculatura esquelética (GOSKER *et al.*, 2003a; GOSSELINK; TROOSTERS; DECRAMER, 1996; SCHOLS *et al.*, 1991). A perda de massa muscular esquelética é uma comum observação sistêmica (BERNARD *et al.*, 1998; ENGELEN *et al.*, 2000b; SCHOLS *et al.*, 1993) em pacientes com DPOC, mais acentuadamente observado em casos de enfisema, e esta perda pode não somente levar a fadiga (KILLIAN *et al.*, 1992) e à fraqueza muscular (BERNARD *et al.*, 1998; ENGELEN, *et al.*, 2000b; GOSSELINK *et al.*, 1996; SCHOLS *et al.*, 1993), mas também estar associada com mortalidade elevada nestes pacientes. Marquis e colaboradores (2002) relataram que 50% dos seus pacientes com um volume expiratório forçado no primeiro segundo da expiração (VEF1) <25% predito e área seccional transversa da musculatura (AST) da coxa <70cm² morreram em 3 anos, comparados com apenas 12% de pacientes com AST >70cm².

Alguns autores demonstraram que a astenia encontrada em pacientes com DPOC pode ser resultado da atrofia e/ou da mudança do predomínio dos tipos de fibras musculares (ENGELEN *et al.*, 2000b; GOSKER *et al.*, 2002; JOBIN *et al.*, 1998; WHITTOM *et al.*, 1998).

Outras anormalidades na musculatura não-ventilatória foram relatadas em pacientes (SERRES *et al.*, 1998) e também em animais (MATTSON; POOLE 1998) com enfisema pulmonar, como a redução nas atividades enzimáticas oxidativas. Essa redução pode aumentar a ativação de vias anaeróbias para geração de energia requerida. A atrofia da musculatura esquelética e a mudança do predomínio de fibras de contração lenta para rápidas pode afetar a produção de força, resistência à fadiga e prejudicar a tolerância ao exercício (HOLLOSZY; COYLE, 1984).

Mais especificamente, alguns estudos encontraram atrofia das fibras musculares esqueléticas do tipo I (fibras de contração lenta) e/ou II (fibras de contração rápida) em pacientes com DPOC (HUGHES *et al.*, 1983; SATO *et al.*, 1997; WHITTOM *et al.*, 1998) e também em uma variedade de músculos esqueléticos locomotórios de hamsters portadores de enfisema (MATTSON; DELP; POOLE, 2004), além de redução de massa corporal magra em pacientes (YOSHIKAWA *et al.*, 2001) e em hamsters enfisematosos (TONON *et al.*, 2013). Mattson; Delp; Poole (2004) demonstraram atrofia de fibras do tipo IIX e uma mudança do predomínio de composição de fibras demonstrada através da

diminuição de IIA e aparecimento de IIB no músculo gastrocnêmio de hamsters com enfisema.

Outros estudos relataram que pacientes com DPOC possuem menor proporção de fibras do tipo I e elevação da porcentagem de fibras do tipo II no músculo vasto-lateral (FERMOSELLE *et al.*, 2012; GOSKER *et al.*, 2002; JOBIN *et al.*, 1998; WHITTOM *et al.*, 1998) e no quadríceps (LEMIRE *et al.*, 2012). A redução no tipo de fibra IIA, majoritariamente oxidativa, pode prejudicar a função de *endurance*, enquanto o aparecimento de IIB pode colaborar para a preservação da produção de força máxima. Portanto, vias metabólicas alteradas, alteração do predomínio dos tipos de fibras e atrofia destas, parece ser a causa de problemas de aumento da fadiga muscular, redução da produção de força, perda de massa muscular e intolerância ao exercício que estes pacientes apresentam (MATTSON; MARTIN, 2005).

1.1.4 Perfil Oxidativo Muscular no Enfisema Pulmonar

Evidências consistentes demonstram o papel das ERO em várias doenças, como no câncer, diabetes, aterosclerose, doenças crônicas e degenerativas (DROGE, 2002; GIACCO; BROWNLEE, 2010; GOSKER *et al.*, 2005; REPINE.; BAST; LANKHORST, 1997; REUTER *et al.*, 2010). Essas espécies são geradas como produtos derivados do próprio metabolismo celular. Quantidades pequenas (fisiológicas) dessas espécies são necessárias porque estão envolvidas numa variedade de atividades celulares, incluindo sinalização para secreção de citocinas, crescimento, diferenciação, expressão gênica e na defesa contra patógenos. No entanto, as ERO também têm o potencial de induzir danos biológicos. Desta maneira, as células possuem vários sistemas antioxidantes para inativar ou eliminar essas espécies (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HENSLEY *et al.*, 2000; POWERS; TALBERT; ADHIHETTY, 2011).

Sob condições fisiológicas, há um balanço entre a formação e a neutralização de ERO, e também de espécies reativas de nitrogênio (ERN, como o peroxinitrito), e espécies reativas do cloro (tais como o ácido hipocloroso) desses sistemas. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas está acelerada ou quando os mecanismos envolvidos na manutenção do microambiente

reduzidor celular estão diminuídos (ex: mutações que afetam enzimas antioxidantes de defesa, como na esclerose lateral amiotrófica). O estresse oxidativo pode causar danos às biomoléculas, tais como proteínas e lipídios (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) e ainda modular vias de sinalização e causar interrupção de controle homeostático, o que pode levar a várias doenças moduladas pelo processo oxidativo (JONES, 2006).

As defesas oxidantes são compostas por agentes que removem as espécies reativas cataliticamente, como (a) superóxido dismutase e redutase, a catalase e as enzimas peroxidases; (b) agentes que diminuem a formação de espécies reativas, como as proteínas mitocondriais desacopladoras e transferrinas; (c) proteínas que protegem as biomoléculas contra o dano oxidativo de outras maneiras, como as chaperonas; (d) agentes de “sacrifício”, que são oxidados preferencialmente pelas espécies reativas para preservar biomoléculas mais importantes, como a GSH, o α -tocoferol, bilirrubina, ascorbato, urato e albumina (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Dentre as enzimas, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase, e a glutathione peroxidase (GSH-Px). Especificamente, a glutathione peroxidase (GSH-Px), responsável pela detoxificação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), possui menos especificidade para o substrato, sendo capaz também de reduzir hidroperóxidos orgânicos a álcool. A GSH-Px remove o H_2O_2 acoplando a sua redução à água (H_2O) com a oxidação da glutathione (GSH), um tripeptídeo que contém um grupo tiol. A conversão da glutathione oxidada (GSSG) à sua forma reduzida é alcançada pela enzima glutathione redutase. Devido aos altos níveis presentes na célula de GSSG/GSH, são conhecidos como os maiores contribuidores do “estado redox” das células, contribuindo ainda na prevenção de oxidação e ligações cruzadas nos grupamentos sulfidril das proteínas (ENGELEN *et al.*, 2000a; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Acredita-se que, geralmente, o aumento da produção de espécies reativas ocorra mais frequentemente do que a diminuição da defesa antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo tem sido expressivamente relacionado ao enfisema pulmonar (COUILLARD *et al.*, 2002; COUILLARD *et al.*, 2003; GOSKER *et al.*, 2005; TONON *et al.*, 2013; VAN HELVOORT *et al.*, 2006). A própria hipóxia e o custo energético aumentado da respiração celular causam um aumento na geração

de ERO e ERN nos pulmões e no tecido muscular, que então podem causar efeitos deletérios à distância por seus intermediários (HEUNKS; DEKHUIJZEN, 2000).

Está claro que há uma importante participação da geração de espécies reativas no pulmão na patogenia da DPOC. No entanto, esse desbalanço no ambiente redox parece se estender além do pulmão doente (LANGEN; KORN; WOUTERS, 2003). Koechlin e colaboradores (2005) verificaram que pacientes DPOC com hipoxemia crônica demonstravam níveis aumentados de lipoperoxidação e oxidação de proteínas induzidas pelo exercício no quadríceps quando comparados a pacientes DPOC não-hipoxêmicos. (KOECHLIN *et al.*, 2005).

Algumas evidências sugerem que uma das principais fontes do aumento de ERO muscular na DPOC esteja relacionada à disfunção mitocondrial. Saulea e colaboradores (1998) demonstraram que a atividade citocromo c oxidase esteve aumentada no quadríceps de pacientes DPOC com insuficiência respiratória. Além disso, já foi demonstrado que a expressão da proteína desacopladora 3 (UCP3) esteve reduzida no quadríceps de pacientes DPOC, fato que estaria relacionado ao aumento de ERO pela mitocôndria (GOSKER *et al.*, 2003b; RUSSELL *et al.*, 2004). O desenvolvimento do EO no músculo esquelético periférico de pacientes DPOC também tem sido atribuído à redução da capacidade antioxidante. Alguns estudos relatam diminuição de níveis plasmáticos de antioxidantes não-enzimáticos, tanto ao repouso quanto após exercício, quando comparados à indivíduos controle (RAHMAN *et al.*, 1996; COUILLARD *et al.*, 2002)

1.1.5 Espécies Reativas nas Vias de Sinalização Celular

As espécies reativas são importantes mensageiras das vias de sinalização envolvidas na adaptação celular (ALLEN; TRESINI, 2000; DOUCET *et al.*, 2007; POWERS; TALBERT; ADHIHETTY, 2011; UPHAM; TROSKO, 2009). Enquanto altas concentrações dessas espécies podem lesar componentes celulares, níveis baixos a moderados podem desempenhar múltiplas funções regulatórias em vias de sinalização celular, como o controle da expressão gênica (UPHAM; TROSKO, 2009) e modulação da função do músculo estriado esquelético (IRRCHER *et al.*, 2008; POWERS *et al.*, 2011). A sinalização da expressão por espécies reativas contribui tanto para a adaptação de fibras musculares em resposta ao

exercício e para o aumento da função contrátil (GOMEZ-CABRERA *et al.*, 2005; REID; KHAWLI; MOODY *et al.*, 1993), quanto na atrofia associada a períodos prolongados de desuso (KONDO; NISHINO; ITOKAWA, 1994). Este paradoxo na sinalização quanto à função das ERO e ERN deve-se provavelmente a diferenças tanto na magnitude, quanto no padrão temporal da produção dessas espécies (POWERS *et al.*, 2010; POWERS *et al.*, 2011)

De maneira geral, o principal mecanismo pelo qual a sinalização redox controlaria a expressão gênica seria por meio do controle das quinases e fosfatases pela fosforilação/desfosforilação de proteínas ou peptídeos responsáveis, por sua vez, pelo aumento ou a ativação de fatores de transcrição (CHIARUGI; CIRRI, 2003; TORRES; FORMAN, 2003). As ERO são conhecidas por ativar o fator de transcrição nuclear κ -B (NF- κ B), e isso parece ser fundamental para a adaptação celular do músculo estriado, tanto em estados fisiológicos, quanto patológicos (KANDARIAN; JACKMAN, 2006; POWERS; TALBERT; ADHIHETTY, 2011). Evidências têm indicado que NF- κ B regula a expressão de mais de 150 genes (PAHL, 1999), e pesquisas têm identificado alguns alvos específicos requeridos para o remodelamento celular, principalmente no que diz respeito ao músculo estriado esquelético (ROMMEL *et al.*, 2001; KRAMER; GOODYEAR, 2007).

O NF- κ B abrange uma família de cinco fatores de transcrição (p65, p50, Rel B, c-Rel, e p52). Duas destas proteínas precisam se dimerizar para induzir a ligação do NF- κ B ao ácido desoxirribonucleico (DNA) que, quando ativado, pode promover uma série de resultados, dependendo do tipo celular. No músculo estriado, todos os cinco membros da família são expressos, mas evidências recentes sugerem que as subunidades p50 e p65 são responsáveis pela maior parte da atividade do NF- κ B nesse tecido (HUNTER *et al.*, 2002; JACKMAN; KANDARIAN, 2004).

Em células em equilíbrio redox, a seqüência do NF- κ B é ligada à proteína inibitória I κ B no citosol, que previne a dimerização da p50 e p65, e conseqüentemente o seu movimento para o núcleo. No entanto, aumento de ERO no citosol pode ativar a I κ B- α quinase (IKK), resultando na fosforilação da I κ B (HUANG *et al.*, 1997; KABE *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que a ativação da via do NF- κ B foi suficiente para induzir atrofia significativa, observada por meio de aumento na excreção de aminoácidos e *turnover* de tirosina em músculos isolados (CAI *et al.*, 2004). Este grupo de autores também demonstrou que existe uma via de

sinalização IKKb/NF- κ B/MuRF-1 (*muscle ring finger* – proteína ligada a codificação de ubiquitinas-ligases) no qual um estímulo atrofico resulta na ativação do NF- κ B, que por sua vez induz a atrofia, em parte, via supra regulação de MuRF-1 (CAI *et al.*, 2004).

Outro fator conhecido envolvido na sinalização tanto da atrofia quanto da hipertrofia é a proteína kinase B (AKT), que também é susceptível aos efeitos das ERO e ERN (NADER, 2005). Sabe-se que em seu estado fosforilado, a AKT está apta a bloquear a proteólise por meio da sub-regulação de duas enzimas ligases músculo específicas, a atrogin-1 e a MuRF-1 (BODINE *et al.*, 2001) por intermédio da fosforilação da classe de fatores de transcrição *forkhead box* O 1 e 3 (FoxO1, FoxO3 respectivamente) (SANDRI *et al.*, 2004; VAN DER HEIDE; HOEKMAN; SMIDT, 2004) e consequente sequestro desta para fora do núcleo, onde então estará inapta a ativar a transcrição das E3 ubiquitinas-ligases específicas do músculo que levariam a atrofia (SANDRI *et al.*, 2004; STITT *et al.*, 2004). Ao mesmo tempo, na forma fosforilada, a AKT também tem o papel de estimular uma variedade de vias hipertróficas, incluindo a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (GLASS, 2005; NADER, 2005).

1.1.6 Modificação Oxidativa de Proteínas

Como citado anteriormente, níveis moderados de espécies reativas possuem papel sinalizador na adaptação muscular. Porém um aumento persistente dessas espécies, em longo prazo, pode causar perda de massa e/ou disfunção na musculatura periférica, por meio da modulação das vias de sinalização que levam a proteólise (KOECHLIN *et al.*, 2005; OTTENHEIJM *et al.*, 2006). Em síntese, essa sinalização pode levar a proteólise por várias vias, algumas diretas e outras indiretas. Há possibilidade de: a) aumento do cálcio citosólico causando ativação da calpaína, que por sua vez, cliva as proteínas que ancoram o complexo actina-miosina, liberando os componentes proteicos do sarcômero para que então estejam aptos a degradação (HUANG; FORSBERG, 1998; SIEMS *et al.*, 2003) b) ativação de caspase-3 que degrada diretamente o complexo actina-miosina (BRAGA, M. *et al.*, 2008; WHIDDEN *et al.*, 2010) c) estimulação da conjugação de ubiquitina às proteínas musculares (LI *et al.*, 2003; POWERS *et al.*, 2011).

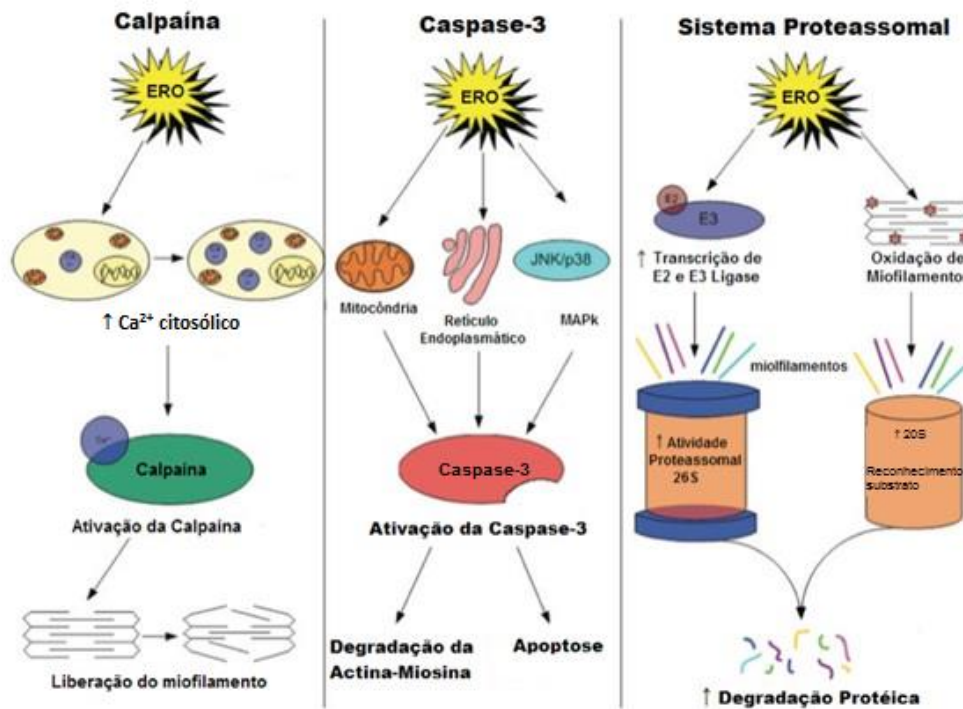


Figura 2. Ativação de vias proteolíticas pelas espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético, incluindo calpaina, caspase-3 e o sistema proteossomal.

Fonte: Adaptado de Powers *et al* (2010).

Porém, deve-se considerar outra maneira importante em que o estresse oxidativo leva à proteólise: a oxidação de proteínas. As proteínas estão entre os maiores alvos dos oxidantes devido à sua susceptibilidade para várias reações com espécies reativas e sua abundância nos sistemas biológicos (DICKINSON; CHANG, 2011).

De maneira geral, as proteínas podem ser danificadas por oxidação de duas maneiras: a) diretamente pelas ERO e ERN que atacam o esqueleto das proteínas ou cadeias laterais de aminoácidos; b) indiretamente pela formação de glicação ou glicoxidação proteica e produtos da peroxidação lipídica (ex: malondialdeído e hidroxinonal) que reagem de várias maneiras com as proteínas. Produtos destas interações com proteínas levam então à nitração, tiolação e oxidação de cadeias laterais e à formação de resíduos carbonílicos, dentre outras modificações oxidativas (HOHN; KONIG; GRUNE, 2013; SOROLLA *et al.*, 2012).

Modificações oxidativas de enzimas e de proteínas estruturais exercem um papel significativo na etiologia e/ou progressão de várias doenças em humanos.

O conteúdo de proteínas carboniladas é o maior biomarcador geral, mais usado e mais estável de dano oxidativo proteico (DALLE-DONNE *et al* 2003; HOHN *et al* 2013; REQUENA.; LEVINE; STADTMAN, 2003). Várias doenças estão associadas com a carbonilação de proteínas, entre elas a doença de Alzheimer, doenças crônicas pulmonares e renais, diabetes e sepse (DALLE-DONNE *et al.*, 2003; HOHN *et al.*, 2013). Uma supra-regulação adaptativa dos sistemas de defesa pode proteger contra o dano, de forma completa ou parcial. Porém o dano mediado pelo EO a vários tipos de macromoléculas biológicas, frequentemente leva à lesão tecidual e eventualmente à morte celular (DALLE-DONNE *et al.*, 2003).

As reações de oxidação ou de nitração das biomoléculas alteram a sua estrutura pela incorporação de novos grupos funcionais, tais como as hidroxilas, cetonas e aldeídos que podem influenciar na atividade biológica, inclusive levando à perda ou ganho de função (FEDOROVA; BOLLINENI; HOFFMANN, 2014).

Mais especificamente, a carbonilação de proteínas ocorre quando as proteínas reagem diretamente com as ERO, levando à formação de derivados proteicos ou fragmentos de peptídeos contendo grupamentos carbonílicos altamente reativos, tais como aldeídos e cetonas (STADTMAN; LEVINE, 2003). Além disso, reações secundárias dos grupamentos primários amina, de resíduos de lisina com açúcares redutores ou seus produtos de oxidação, conhecidos como glicação ou glicoxidação ou ambos, também podem gerar grupamentos carbonílicos nas proteínas (FEDOROVA; BOLLINENI; HOFFMANN, 2014; STADTMAN; LEVINE, 2003). O estresse carbonílico, que é caracterizado pelo acúmulo de espécies reativas carboniladas, resulta em disfunções biomoleculares e aumento da toxicidade celular (CURTIS *et al.*, 2012).

As miofibrilas são altamente sensíveis ao estresse oxidativo. Em várias condições patológicas, incluindo sepse, isquemia/reperfusão, diabetes e DPOC, há evidências que demonstram a carbonilação das proteínas dos miofilamentos dos músculos respiratórios e periféricos. Dentre as proteínas que sofrem essa forma de oxidação encontram-se as proteínas da maquinaria contrátil, como a actina, miosina de cadeia leve e pesada, a desmina, tropomiosina (BARREIRO *et al.*, 2005a; BARREIRO *et al.*, 2005b; NAGASAWA *et al.*, 1997; OH-ISHI; UENO; MAEDA, 2003) e a troponina (FEDOROVA *et al.*, 2010). O aumento da carbonilação já foi associado à redução da velocidade de deslizamento dos filamentos de actina em

aproximadamente 22%, proporcionando assim uma relação funcional entre o nível de modificação e atividade contrátil (VIKHOREVA *et al.*, 2009).

As proteínas modificadas pelo processo de oxidação estão propensas à degradação pelo sistema proteassomal. As proteínas podem ser degradadas de duas formas: através do proteassoma 26S (ATP-ubiquitina dependente) e pelo 20S (independente de ubiquitinação). Alguns estudos indicam que proteínas danificadas por oxidação são degradadas preferencialmente pelo 20S, enquanto que a atividade 26S pode diminuir durante o EO (CHONDROGIANNI *et al.*, 2014; JUNG; GRUNE, 2008; PICKERING *et al.*, 2010; REINHECKEL *et al.*, 1998).

Proteínas desdobradas parcialmente (oxidadas, carboniladas dentre outras modificações) apresentam porções hidrofóbicas reconhecidas pelo proteassoma 20S e se segue o processo de degradação. No entanto, em condições severas de estresse oxidativo, uma extensa carbonilação de proteínas, por exemplo, pode levar a formação de agregados de proteína, os quais podem bloquear o 20S (FEDOROVA *et al.*, 2014). Recentemente, Castro *et al* (2012) demonstraram a colocalização de agregados de actina carbonilada e o 20S, e diminuição da atividade proteassomal 20S.

Apesar de a carbonilação estar fortemente associada à diminuição de função e atividade metabólica, essa modificação oxidativa também pode ativar algumas vias de sinalização, através das modificações derivadas de produtos da lipoperoxidação ao resíduo crítico de tiol nas proteínas de sinalização. Já foi demonstrado que essa ação pode resultar em um estímulo à resposta antioxidante (CURTIS *et al.*, 2012). Nesse sentido, os papéis do fator nuclear eritróide 2 - relativo ao fator 2 (Nrf2) e da proteína derivada de células eritróides tipo kelch com homologia CNC - associadas à proteína 1 (Keap1) no controle do elemento de resposta antioxidante (ARE) foi descrito. Sob condições fisiológicas, Keap1 se liga ao Nrf2 e então o marca para degradação através do proteassoma. Durante condições de estresse oxidativo, dois resíduos críticos de tiol (Cys273, Cys288) do Keap1 são carbonilados, levando a liberação do Nrf2. Então, o Nrf2 migra ao núcleo, onde se complexa com uma variedade de fatores nucleares e se liga a ARE, desta forma, ativa a expressão de genes antioxidantes como a heme oxigenase, glutatona e tiorredoxina redutase e enzima de detoxificação de fase II (NOGUCHI, 2008).

De forma geral, o processo de oxidação das proteínas ocorre passo a passo. Quando uma proteína nativa, na sua forma ativa, é exposta a quantidades

crecentes de oxidantes, mais e mais cadeias laterais de aminoácidos são oxidadas. Posteriormente, com a persistência do estresse oxidativo ocorre oxidação avançada, que é acompanhada por um aumento no desdobramento da proteína. Então, dependendo do nível de desdobramento, há diferentes destinos para as proteínas oxidadas. Se estas proteínas não são degradadas ou resgatadas, estruturas hidrofóbicas expostas tendem a formar agregados. O material que emerge é conhecido como lipofuscina. Esse tipo de proteína se torna um substrato inadequado para o proteassoma. Além disto, esses agregados podem causar inibição proteassomal (HOHN *et al.*, 2011; SITTE *et al.*, 2000).





MODIFICAÇÃO		PROPRIEDADES
Proteína nativa		Ativa Dobrada corretamente
Proteína oxidada mas sem ligação cruzada		Modificação oxidativa progressiva
		Aumento do desdobramento Aumento da perda da atividade Degradação proteossomal dependente da modificação oxidativa
Altamente oxidada, com ligação cruzada = Lipofuscina		Material insolúvel e indegradável Inibição do proteassoma Efeitos citotóxicos

Figura 3. Modificação oxidativa das proteínas de acordo com a intensidade do estímulo oxidativo.

Fonte: Adaptado de Hohn, *et al* (2013).

A formação de lipofuscina inicia-se com dano oxidativo às proteínas. Em caso de falha de remoção ou danos aos sistemas de reparo, proteínas oxidadas fazem ligação cruzada e tornam-se prejudicadas funcionalmente e alteram sua estrutura. Proteínas de ligação cruzada são tomadas via autofagia por lisossomos, onde são processados levando a formação de lipofuscina. Eventualmente, os lisossomos são sobrecarregados e se rompem. A lipofuscina é então liberada para o citosol e então é capaz de inibir o proteassoma. Para evitar isso, lipofuscina é tomada novamente e o ciclo se repete (HOHN *et al.*, 2013).

Existem evidências consistentes da participação do EO como modulador das vias de sinalização que levam a adaptação muscular, ou mesmo da sua ação direta sobre o músculo. Tendo em vista todas as adaptações e modificações oxidativas que podem ocorrer no músculo esquelético frente ao enfisema pulmonar e o grande número de efeitos deletérios dessas adaptações às atividades de vida diária dos indivíduos com enfisema, há alguns modelos experimentais para desenvolvimento do enfisema pulmonar com objetivo de esclarecer os mecanismos envolvidos na perda de massa muscular em decorrência desta doença, para permitir o desenvolvimento de tratamentos que melhorem a qualidade de vida do paciente.

2 JUSTIFICATIVA

Por vários anos, a DPOC tem sido reconhecida como uma doença multifacetária que envolve outras estruturas além do pulmão doente, dentre elas, a musculatura estriada esquelética. Evidências apontam para o envolvimento das espécies reativas na perda de massa muscular nesta doença, o que colabora de forma significativa para o aumento da morbidade e mortalidade nestes casos. Por outro lado, o enfisema pulmonar em geral pode progredir lentamente ao longo de muitos anos (LOKKE *et al.*, 2006; SHAVELLE *et al.*, 2009). Portanto, compreender os efeitos patológicos da doença no músculo esquelético pode ter implicações importantes ao longo do tempo o que colaboraria para possíveis estratégias terapêuticas específicas de acordo com as manifestações. Muitos são os modelos experimentais usados no estudo do enfisema pulmonar (MAHADEVA; SHAPIRO, 2002; TARASEVICIENE-STEWART *et al.*, 2005; WRIGHT; CHURG, 2010; TOLEDO *et al.*, 2012). No entanto, os modelos que utilizam enzimas proteolíticas não apresentaram, no decorrer dos anos, comparações no âmbito da evolução desta comorbidade (FERMOSELLE; SANCHEZ; BARREIRO, 2011; HEUNKS *et al.*, 2000; MATTSON; DELP; POOLE, 2004; TONON *et al.*, 2013; VAN HEES *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2010). Este parece ser um aspecto importante no entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença, principalmente no que concerne a influência do estresse oxidativo na perda de massa muscular apresentada na evolução desta classe de paciente. Compreender os efeitos patológicos da doença no músculo esquelético parece ter implicações importantes ao longo do tempo e certamente se constitui no entendimento de uma possibilidade terapêutica para prolongar a vida do paciente e desacelerar a evolução desta comorbidade relacionada ao enfisema.

3 HIPÓTESE

No enfisema pulmonar, a adaptação do músculo estriado esquelético relacionada ao estresse oxidativo muda com o tempo, mesmo que o estímulo original causador da doença não evolua.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar manifestações músculoesqueléticas e a possível influência do estresse oxidativo sobre a modificação de proteínas e adaptação do músculo estriado esquelético aos 60 e 180 dias após a indução experimental de enfisema por meio de instilação intratraqueal de papaína.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se a indução ao enfisema pulmonar por meio desse modelo é estável com o tempo, e a evolução da perda de massa muscular evolui independentemente da severidade da doença;

Verificar possível influência de processo inflamatório sistêmico e local sobre a modulação da massa muscular;

Verificar a correlação entre a alteração oxidativa muscular e a atividade do barril proteassomal.

Esta dissertação teve como objetivo a elaboração de um artigo científico. Na avaliação geral dos resultados, chegamos à conclusão de que o músculo esquelético periférico se adapta fortemente influenciado pelo estresse oxidativo e pelo tempo de exposição à doença, tendo em vista que a doença se apresentou estável neste modelo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 3, p. 463-99, Feb 1 2000.
- BARREIRO, E. et al. Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, n. 10, p. 1116-24, May 15 2005 (a).
- BARREIRO, E. et al. Protein carbonyl formation in the diaphragm. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 32, n. 1, p. 9-17, Jan 2005 (b).
- BARREIRO, E. et al. Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD. **Thorax**, v. 63, n. 2, p. 100-7, Feb 2008.
- BERNARD, S. et al. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 158, n. 2, p. 629-34, Aug 1998.
- BHOWMIK A et al. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. **Thorax** 55: 114-120, Nov 1999.
- BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704-8, Nov 23 2001.
- BRAGA, M. et al. Involvement of oxidative stress and caspase 2-mediated intrinsic pathway signaling in age-related increase in muscle cell apoptosis in mice. **Apoptosis**, v. 13, n. 6, p. 822-32, Jun 2008.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 408-412.
- BUCCHIONI et al. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. **Respir Med** 97: 1299-1302, Nov 2003.
- GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ Res**, v. 107, n. 9, p. 1058-70, Oct 29 2010.
- CAI, D. et al. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell**, v. 119, n. 2, p. 285-98, Oct 15 2004.
- CASTRO, J. P. et al. Carbonylation of the cytoskeletal protein actin leads to aggregate formation. **Free Radic Biol Med**, v. 53, n. 4, p. 916-25, Aug 15 2012.
- CELLI, B. R.; MACNEE, W.; FORCE, A. E. T. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. **Eur Respir J**, v. 23, n. 6, p. 932-46, Jun 2004.
- AMERICAN LUNG ASSOCIATION. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Health Statistics. **National Health Interview Survey Raw Data**, 2011. Analysis performed by the American Lung Association Research and Health Education Division using SPSS and SUDAAN software. Disponível em:

<<http://www.lung.org/finding-cures/our-research/trend-reports/copd-trend-report.pdf>>. Acesso em 20 jul 2015

Centers for Disease Control and Prevention. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Surveillance – United States, 1971-2000. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. August 2, 2002; 51(SS06):1-16. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5106a1.htm>>. Acesso em 20 jul 2015

CHIARUGI, P.; CIRRI, P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. **Trends Biochem Sci**, v. 28, n. 9, p. 509-14, Sep 2003.

CHONDROGIANNI, N. et al. Protein damage, repair and proteolysis. **Mol Aspects Med**, v. 35, p. 1-71, Feb 2014.

COUILLARD, A. et al. Evidence of local exercise-induced systemic oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients. **Eur Respir J**, v. 20, n. 5, p. 1123-9, Nov 2002.

COUILLARD, A. et al. Exercise-induced quadriceps oxidative stress and peripheral muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 167, n. 12, p. 1664-9, Jun 15 2003.

CURTIS, J. M. et al. Protein carbonylation and metabolic control systems. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23, n. 8, p. 399-406, Aug 2012.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. **Trends Mol Med**, v. 9, n. 4, p. 169-76, Apr 2003.

DATASUS: MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. 2004. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: 17 de fev. 2015.

DEGENS, H.; VEERKAMP, J.H. Changes in oxidative capacity and fatigue resistance in skeletal muscle. **Int J Biochem**, v.26, p. 871-878, Aug 1994.

DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nat Chem Biol**, v. 7, n. 8, p. 504-11, Aug 2011.

DI STEFANO A et al. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J** 24: 78-85, Mar 2004.

DOUCET, M. et al. Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n. 3, p. 261-9, Aug 1 2007.

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

ENGELEN, M. et al. Altered glutamate metabolism is associated with reduced muscle glutathione levels in patients with emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, n. 1, p. 98-103, Jan 2000(a).

- ENGELEN, M. et al. Skeletal muscle weakness is associated with wasting of extremity fat-free mass but not with airflow obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 733-738, Mar 2000(b).
- FEDOROVA, M.; BOLLINENI, R. C.; HOFFMANN, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. **Mass Spectrom Rev**, v. 33, n. 2, p. 79-97, Mar-Apr 2014.
- FEDOROVA, M. et al. Quantitative evaluation of tryptophan oxidation in actin and troponin I from skeletal muscles using a rat model of acute oxidative stress. **Proteomics**, v. 10, n. 14, p. 2692-700, Jul 2010.
- FERMOSELLE, C. et al. Does oxidative stress modulate limb muscle atrophy in severe COPD patients? **Eur Respir J**, v. 40, n. 4, p. 851-62, Oct 2012.
- FLETCHER, C.; PETO, R.; TINKER, R.; SPEIZER, F. E. The Natural History of Chronic Bronchitis and Emphysema. **Oxford University Press**, Feb 1976.
- FLETCHER C. M.; PETO, R. The natural history of chronic airflow obstruction. **BMJ**, p. 1645-1648, Mar 1977.
- GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 10, p. 1974-84, Oct 2005.
- GOMEZ-CABRERA, M. C. et al. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. **J Physiol**, v. 567, n. Pt 1, p. 113-20, Aug 15 2005.
- GOSKER, H. R. et al. Altered antioxidant status in peripheral skeletal muscle of patients with COPD. **Respir Med**, v. 99, n. 1, p. 118-25, Jan 2005.
- GOSKER, H. R. et al. Striking similarities in systemic factors contributing to decreased exercise capacity in patients with severe chronic heart failure or COPD. **Chest**, v. 123, n. 5, p. 1416-24, May 2003 (a).
- GOSKER, H. R. et al. Uncoupling protein-3 content is decreased in peripheral skeletal muscle of patients with COPD. **Eur Respir J**, v. 22, n. 1, p. 88-93, Jul 2003 (b).
- GOSKER, H. R. et al. Skeletal muscle fibre-type shifting and metabolic profile in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J**, v. 19, n. 4, p. 617-25, Apr 2002.
- GOSSELINK, R.; TROOSTERS, T.; DECRAMER, M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 153, n. 3, p. 976-80, Mar 1996.
- GUARNIER, F. A. et al. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor. **Muscle Nerve**, v. 42, n. 6, p. 950-8, Dec 2010.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Oxford University Press, 2007. 704

- HENSLEY, K. et al. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 10, p. 1456-62, May 15 2000.
- HEUNKS, L. M.; DEKHUIJZEN, P. N. Respiratory muscle function and free radicals: from cell to COPD. **Thorax**, v. 55, n. 8, p. 704-16, Aug 2000.
- HOHN, A. et al. Lipofuscin inhibits the proteasome by binding to surface motifs. **Free Radic Biol Med**, v. 50, n. 5, p. 585-91, Mar 1 2011.
- HOHN, A.; KONIG, J.; GRUNE, T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. **J Proteomics**, v. 92, p. 132-59, Oct 2013.
- HOGG, J. C. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet**, v. 364, p. 709-721, 2004.
- HOLLOSZY, J. O.; COYLE, E. F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 56, n. 4, p. 831-8, Apr 1984.
- HU, G. et al. Development and systematic oxidative stress of a rat model of chronic bronchitis and emphysema induced by biomass smoke. **Exp Lung Res**, v. 39, n. 6, p. 229-40, Aug 2013.
- HUANG, D. B. et al. The role of DNA in the mechanism of NFkappaB dimer formation: crystal structures of the dimerization domains of the p50 and p65 subunits. **Structure**, v. 5, n. 11, p. 1427-36, Nov 15 1997.
- HUANG, J.; FORSBERG, N. E. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 21, p. 12100-5, Oct 13 1998.
- HUBER, M. B. et al. Excess costs of comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123292, 2015.
- HUGHES, R. L. et al. Fiber size and energy metabolites in five separate muscles from patients with chronic obstructive lung diseases. **Respiration**, v. 44, n. 5, p. 321-8, 1983.
- HUNTER, R. B. et al. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. **FASEB J**, v. 16, n. 6, p. 529-38, Apr 2002.
- IRRCHEER, I. et al. AMP-activated protein kinase-regulated activation of the PGC-1alpha promoter in skeletal muscle cells. **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3614, 2008.
- JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S. C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 287, n. 4, p. C834-43, Oct 2004.
- JOBIN, J. et al. Chronic obstructive pulmonary disease: capillarity and fiber-type characteristics of skeletal muscle. **J Cardiopulm Rehabil**, v. 18, n. 6, p. 432-7, Nov-Dec 1998.
- JUNG, T.; GRUNE, T. The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. **IUBMB Life**, v. 60, n. 11, p. 743-52, Nov 2008.

- KABE, Y. et al. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 3-4, p. 395-403, Mar-Apr 2005.
- KANDARIAN, S. C.; JACKMAN, R. W. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. **Muscle Nerve**, v. 33, n. 2, p. 155-65, Feb 2006.
- KILLIAN, K. J. et al. Exercise capacity and ventilatory, circulatory, and symptom limitation in patients with chronic airflow limitation. **Am Rev Respir Dis**, v. 146, n. 4, p. 935-40, Oct 1992.
- KIM, W. D. et al. Centrilobular and panlobular emphysema in smokers. Two distinct morphologic and functional entities. **Am Rev Respir Dis**, v. 144, n. 6, p. 1385-90, Dec 1991.
- KOECHLIN, C. et al. Hypoxaemia enhances peripheral muscle oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v. 60, n. 10, p. 834-41, Oct 2005.
- KONDO, H.; NISHINO, K.; ITOKAWA, Y. Hydroxyl radical generation in skeletal muscle atrophied by immobilization. **FEBS Lett**, v. 349, n. 2, p. 169-72, Aug 1 1994.
- KRAMER, H. F.; GOODYEAR, L. J. Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 103, n. 1, p. 388-95, Jul 2007.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; V; NELSON, F.; MITCHELL, R.N. O Pulmão in **Robbins Patologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- LARSSON, K. Aspects on pathophysiological mechanisms in COPD. **Blackwell Publishing Ltd Journal of Internal Medicine**, v. 262, p. 311-340, 2007.
- LEMIRE, B. B. et al. MAPK signaling in the quadriceps of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **J Appl Physiol (1985)**, v. 113, n. 1, p. 159-66, Jul 2012.
- LANGEN, R. C.; KORN, S. H.; WOUTERS, E. F. ROS in the local and systemic pathogenesis of COPD. **Free Radic Biol Med**, v. 35, n. 3, p. 226-35, Aug 2003
- LI, Y. P. et al. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 285, n. 4, p. C806-12, Oct 2003.
- LOKKE, A. et al. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. **Thorax**, v. 61, n. 11, p. 935-9, Nov 2006.
- LOPEZ, A. D. et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. **Eur Respir J**, v. 27, n. 2, p. 397-412, Feb 2006.
- MACNEE, W. Pathology, pathogenesis, and pathophysiology. **BMJ : British Medical Journal**, v. 332, n. 7551, p. 1202-1204, 2006.
- MACNEE, W. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Proc Am Thorac Soc**, v. 2., p. 258-266, 2005.

- MAHADEVA, R.; SHAPIRO, S. D. Chronic obstructive pulmonary disease * 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. **Thorax**, v. 57, n. 10, p. 908-14, Oct 2002.
- MARQUIS, K. et al. Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 166, n. 6, p. 809-13, Sep 2002.
- MATTSON, J. P.; DELP, M. D.; POOLE, D. C. Differential effects of emphysema on skeletal muscle fibre atrophy in hamsters. **Eur Respir J**, v. 23, n. 5, p. 703-7, May 2004.
- MATTSON, J. P.; MARTIN, J. C. Emphysema-induced reductions in locomotory skeletal muscle contractile function. **Exp Physiol**, v. 90, n. 4, p. 519-25, Jul 2005.
- MATTSON, J. P.; POOLE, D. C. Pulmonary emphysema decreases hamster skeletal muscle oxidative enzyme capacity. **J Appl Physiol**, v. 85, n. 1, p. 210-4, Jul 1998.
- MATTSON, J. P. et al. Lipid peroxidation in the skeletal muscle of hamsters with emphysema. **Pathophysiology**, v. 8, n. 3, p. 215-221, Jun 2002.
- MENEZES A.M.; JARDIM J.R.; PÉREZ-PADILLA, R.; CAMELIER, A.; ROSA F.; NASCIMENTO, O. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO Study in São Paulo, Brazil. **Cad Saude Publica**, n.21,v.5, p.1565-1573, 2005.
- MENEZES, A. M. et al. Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part II. Burden of chronic obstructive lung disease in Latin America: the PLATINO study. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 12, n. 7, p. 709-12, Jul 2008.
- MITCHELL, R. S. et al. Are centrilobular emphysema and panlobular emphysema two different diseases? **Hum Pathol**, v. 1, n. 3, p. 433-41, Sep 1970.
- MONTEIRO, R. et al. Avaliação das alterações morfológicas cardíacas secundárias ao enfisema pulmonar: estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 19, p. 341-347, Oct 2004.
- MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1498-504, May 24 1997.
- NADER, G. A. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 10, p. 1985-96, Oct 2005.
- NAGASAWA, T. et al. Free radical-mediated effects on skeletal muscle protein in rats treated with Fe-nitritotriacetate. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 231, n. 1, p. 37-41, Feb 3 1997.
- NOGUCHI, N. Role of oxidative stress in adaptive responses in special reference to atherogenesis. **J Clin Biochem Nutr**, v. 43, n. 3, p. 131-8, Nov 2008.
- O'DONNELL, D. E.; LAVENEZIANA, P. Dyspnea and activity limitation in COPD: mechanical factors. **COPD**, v. 4, n. 3, p. 225-36, Sep 2007.

OGA, T. et al. Longitudinal deteriorations in patient reported outcomes in patients with COPD. **Respir Med**, v. 101, n. 1, p. 146-53, Jan 2007.

OH-ISHI, M.; UENO, T.; MAEDA, T. Proteomic method detects oxidatively induced protein carbonyls in muscles of a diabetes model Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n. 1, p. 11-22, Jan 2003.

OTTENHEIJM, C. A. et al. Activation of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 174, n. 9, p. 997-1002, Nov 2006.

PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6853-66, Nov 1999.

PAUWELS, R. A.; BUIST, A. S.; CALVERLEY, P. M.; et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 163, p. 1256-1276, Oct 2001.

PICKERING, A. M. et al. The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28alpha beta proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. **Biochem J**, v. 432, n. 3, p. 585-94, Dec 2010.

POWERS, S. K. et al. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. **Exp Physiol**, v. 95, n. 1, p. 1-9, Jan 2010.

POWERS, S. K.; TALBERT, E. E.; ADHIHETTY, P. J. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 9, p. 2129-38, May 1 2011.

RABE, K. F. et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n. 6, p. 532-55, Sep 15 2007.

RAHMAN, I. et al. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 154, n. 4 Pt 1, p. 1055-60, Oct 1996.

REINHECKEL, T. et al. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. **Biochem J**, v. 335 (Pt 3), p. 637-42, Nov 1998.

REID, M. B.; KHAWLI, F. A.; MOODY, M. R. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 75, n. 3, p. 1081-7, Sep 1993.

REPINE, J. E.; BAST, A.; LANKHORST, I. D. A. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, n. 2, p. 341-357, Aug 1997.

REQUENA, J. R.; LEVINE, R. L.; STADTMAN, E. R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. **Amino Acids**, v. 25, n. 3-4, p. 221-6, Dec 2003.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, Dec 1 2010.

- RODRIGUEZ-ROISIN, R. et al. Ventilation-perfusion imbalance and chronic obstructive pulmonary disease staging severity. **J Appl Physiol** (1985), v. 106, n. 6, p. 1902-8, Jun 2009.
- ROMMEL, C. et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. **Nat Cell Biol**, v. 3, n. 11, p. 1009-13, Nov 2001.
- RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R; SCHWARTING, R; STRAYER, D. Sistema Respiratório in Rubin'Pathology 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- RUSSELL, A. P. et al. COPD results in a reduction in UCP3 long mRNA and UCP3 protein content in types I and IIa skeletal muscle fibers. **J Cardiopulm Rehabil**, v. 24, n. 5, p. 332-9, Sep-Oct 2004.
- SANDRI, M. et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 399-412, Apr 2004.
- SATO, Y. et al. Morphologic and histochemical evaluation of muscle in patients with chronic pulmonary emphysema manifesting generalized emaciation. **Eur Neurol**, v. 37, n. 2, p. 116-21, 1997.
- SAULEDA, J. et al. Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 157, n. 5 Pt 1, p. 1413-7, May 1998.
- SCHOLS, A. M. et al. Body composition and exercise performance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v. 46, n. 10, p. 695-9, Oct 1991.
- SCHOLS, A. M. et al. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. **Am Rev Respir Dis**, v. 147, n. 5, p. 1151-6, May 1993.
- SENIOR, R. M.; GRIFFIN, G. L.; MECHAM, R. P. Chemotactic activity of elastin-derived peptides. **J Clin Invest**, v. 66, n. 4, p. 859-62, Oct 1980.
- SERRES, I. et al. Impaired skeletal muscle endurance related to physical inactivity and altered lung function in COPD patients. **Chest**, v. 113, n. 4, p. 900-5, Apr 1998.
- SHAVELLE, R. M. et al. Life expectancy and years of life lost in chronic obstructive pulmonary disease: findings from the NHANES III Follow-up Study. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 4, p. 137-48, 2009.
- SHARAFKHANEH, A.; HANANIA, N. A.; KIM, V. Pathogenesis of emphysema: from the bench to the bedside. **Proc Am Thorac Soc**, v. 5, n. 4, p. 475-7, May 1 2008.
- SIEMS, W. et al. High sensitivity of plasma membrane ion transport ATPases from human neutrophils towards 4-hydroxy-2,3-trans-nonanal. **Life Sci**, v. 73, n. 20, p. 2583-90, Oct 2003.
- SITTE, N. et al. Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. **FASEB J**, v. 14, n. 11, p. 1490-8, Aug 2000.

- SNIDER, G. L.; LUCEY, E. C.; STONE, P. J. Animal models of emphysema. **Am Rev Respir Dis**, v. 133, n. 1, p. 149-69, Jan 1986.
- SOROLLA, M. A. et al. Protein oxidation in Huntington disease. **Biofactors**, v. 38, n. 3, p. 173-85, Jun 2012.
- STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, n. 3-4, p. 207-18, Dec 2003.
- STITT, T. N. et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. **Mol Cell**, v. 14, n. 3, p. 395-403, May 7 2004.
- TAKAHASHI, M. et al. Imaging of pulmonary emphysema: a pictorial review. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 3, n. 2, p. 193-204, 2008.
- TARASEVICIENE-STEWART, L. et al. An animal model of autoimmune emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, n. 7, p. 734-42, Apr 2005.
- THURLBECK, W. M. The incidence of pulmonary emphysema, with observations on the relative incidence and spatial distribution of various types of emphysema. **Am Rev Respir Dis**, v. 87, p. 206-15, Feb 1963.
- TOLEDO, A. C., et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. **Eur Respir J**, v. 39, n. 2, p. 254-64, Feb 2012.
- TONON, J. et al. Lung injury-dependent oxidative status and chymotrypsin-like activity of skeletal muscles in hamsters with experimental emphysema. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 14, p. 39, Jan 2013.
- TORRES, M.; FORMAN, H. J. Redox signaling and the MAP kinase pathways. **Biofactors**, v. 17, n. 1-4, p. 287-96, 2003.
- TRAVIS, J.; SALVESEN, G. S. Human plasma proteinase inhibitors. **Annu Rev Biochem**, v. 52, p. 655-709, 1983.
- UPHAM, B. L.; TROSKO, J. E. Oxidative-dependent integration of signal transduction with intercellular gap junctional communication in the control of gene expression. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 2, p. 297-307, Feb 2009.
- VAN DER HEIDE, L. P.; HOEKMAN, M. F.; SMIDT, M. P. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. **Biochem J**, v. 380, n. Pt 2, p. 297-309, Jun 2004.
- VAN HELVOORT, H. A. et al. Exercise-induced systemic effects in muscle-wasted patients with COPD. **Med Sci Sports Exerc**, v. 38, n. 9, p. 1543-52, Sep 2006.
- VERNOOY J. H et al. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. **Am J Respir Crit Care Med** 166: 1218-1224, Aug 2002.

VIKHOREVA, N. N. et al. The in vitro motility assay parameters of actin filaments from *Mytilus edulis* exposed in vivo to copper ions. **Arch Biochem Biophys**, v. 491, n. 1-2, p. 32-8, Nov 2009.

WHIDDEN, M. A. et al. Oxidative stress is required for mechanical ventilation-induced protease activation in the diaphragm. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 5, p. 1376-1382, May 2010.

WHITTOM, F. et al. Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, n. 10, p. 1467-74, Oct 1998.

WHO, World Health Organization. The Top 10 Causes of Death. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. Acesso em 03 abr 2015

WRIGHT, J. L.; CHURG, A. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. **Expert Rev Respir Med**, v. 4, n. 6, p. 723-34, Dec 2010.

YOSHIKAWA, M. et al. Distribution of muscle mass and maximal exercise performance in patients with COPD. **Chest**, v. 119, n. 1, p. 93-8, Jan 2001.

ANEXOS

ANEXO A

Artigo

**OXIDATIVE-RELATED MUSCULOSKELETAL ADAPTATIONS 60 AND 180 DAYS
AFTER EXPERIMENTAL INDUCTION OF PULMONARY EMPHYSEMA**

Laís R. Sábio¹; Thamara N. X. da Silva¹; Nichelle A. Vieira¹; Cláudia R. Brunquell¹;
Rubens Cecchini²; Flávia A. Guarnier^{1*}

¹ Laboratory of Pathophysiology of Muscle Adaptations, Department of General Pathology, Universidade Estadual de Londrina, PR

² Laboratory of Pathophysiology and Free Radicals, Department of General Pathology, Universidade Estadual de Londrina, PR

Corresponding author:

Flávia A. Guarnier

Laboratory of Pathophysiology of muscle adaptations

Department of Pathological Sciences

Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380,
Campus Universitário

e-mail: faguarnier@uel.br

Phone/Fax +55-43-33714267

86051-990 Londrina, Brazil

Abstract

Pulmonary emphysema is a chronic disease with a long lasting evolution, usually over many years. Despite musculoskeletal disorders are one of the main extrapulmonary effects of emphysema it is unknown if skeletal muscle is affected in time-dependent manner in this disease. Our objective was to characterize musculoskeletal manifestations and the possible influence of oxidative stress on protein modification and adaptation of skeletal muscle at 60 and 180 days after experimental induction of emphysema by intratracheal instillation of papain. For this purpose we investigated the emphysema extent, body weight, muscle weight loss, oxidative stress parameters, proteasomal activity, citrate synthase activity and the possible involvement of inflammatory process in this model in gastrocnemius of emphysemic hamsters. Animals were randomly distributed into four groups according to the experimental time (60 or 180 days) of euthanasia after intratracheal instillation of saline or papain. Our results showed that both groups which received papain instillation developed emphysema and the disease was not progressive with time. The Emphysema-180 group showed a significant decrease in body weight and significant decrease (13.21%) in the gastrocnemius weight when compared to its control. Alterations of oxidative stress parameters were found earlier in Emphysema-60 reflected by a significant increase of protein carbonyl levels (PC) and a significant decrease of reduced glutathione levels (GSH) when compared to its control. However, Emphysema-180 muscles presented a recovery of GSH levels and a decrease in PC levels when they were compared to Emphysema-60. These results allow the conclusion that skeletal muscle adaptation may be influenced by the time of exposure to disease since the pulmonary injury did not progress in this model.

Key-words: emphysema, papain, skeletal muscle, proteolysis, oxidative stress.

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is defined as a preventable and treatable disease state characterized by airflow limitation that is not fully reversible (CELLI; MACNEE; FORCE, 2004). Chronic airflow limitation is caused by an association of small airway disease (obstructive bronchiolitis) and parenchymal destruction (emphysema) (RABE et al., 2007). COPD is one of the major leading causes of morbidity and mortality in the world and Global Burden of Disease study have estimated that COPD is the third leading cause of death worldwide with 80 million of people suffering this disease (LOZANO et al., 2012). It is well established that COPD has important systemic consequences and limb muscle dysfunction is considered one of the major systemic consequence (MALTAIS et al., 2014). COPD patients often present exercise intolerance (SERRES et al., 1998) and loss of muscle mass (BERNARD et al., 1998; ENGELEN et al., 2000; SCHOLS et al., 1993) which is more severely observed in emphysema patients. One important fact is that, muscle loss cannot lead only to fatigue (KILLIAN et al., 1992), muscle weakness and poor quality of life (BERNARD et al., 1998; ENGELEN et al., 2000; GOSSELINK; TROOSTERS; DECRAMER, 1996; SCHOLS et al., 1993), but it is associated with high mortality in these patients (MARQUIS et al., 2002).

Recently, there have been significant advances in the possible sources of limb dysfunction in COPD. The involvement of oxidative stress in limb muscle dysfunction associated with COPD is a factor addressed in several studies. Reactive species play an important role in signaling pathways involved on cellular adaptations (ALLEN; TRESINI, 2000; DOUCET et al., 2007; POWERS; TALBERT; ADHIHETTY, 2011) and even for optimal contractile function (ANDRADE et al., 1998). But while low levels of these species may play multiple regulatory functions in signaling pathways, such as gene expression control and skeletal muscle function, high levels of these reactive species can damage cell components (POWERS; TALBERT; ADHIHETTY et al., 2011).

Carbonyl protein content is the most general, reliable and widely used biomarker of oxidative protein damage (DALLE-DONNE et al., 2001; REQUENA; LEVINE; STADTMAN, 2003). This oxidative modification has been associated with important functional alterations in a variety of structural and enzymatic proteins

(BARREIRO *et al.*, 2005; DALLE-DONNE, *et al* 2007; NAGASAWA *et al.*, 1997; OH-ISHI; UENO; MAEDA, 2003)

Despite all negative consequences that COPD patients can develop, this disease usually progresses slowly over several years. Therefore, to understand the pathological effects of this disease in a time-dependent manner will help to elucidate more suitable therapeutic strategies according to manifestations in each case. There are several experimental models used in the study of pulmonary emphysema (MAHADEVA; SHAPIRO, 2002; TARASEVICIENE-STEWART *et al.*, 2005; WRIGHT; CHURG, 2010; TOLEDO *et al.*, 2012). However, to our knowledge, temporal adaptation of skeletal muscle in animal emphysema models is not well established in the literature. Studies that use proteolytic enzymes to induce emphysema did not show, over the years, comparisons within the evolution of skeletal muscle adaptation (FERMOSELLE; SANCHEZ; BARREIRO, 2011; HEUNKS *et al.*, 2000; MATTSON; DELP; POOLE, 2004; TONON *et al.*, 2013; VAN HEES *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2010). This seems to be an important aspect on understanding the pathophysiology of the disease, especially regarding the influence of oxidative stress in muscle wasting presented in this patient class. In this way, it is possible to study how skeletal muscle adapts during the course of the disease.

Thus, considering the chronic evolution of pulmonary emphysema and its deleterious effects on skeletal muscles, our objective was characterize musculoskeletal manifestations and the possible influence of oxidative stress on protein modification and adaptation of skeletal muscle at 60 and 180 days after experimental induction of emphysema by intratracheal instillation of papain.

Material and Methods

Animals

Adult male Syrian Golden hamsters, weighing 90–130 g, were used (n = 8/group). The animals were given water and standard rodent chow (Nuvilab CR1; Nuvital Nutrients Ltd., Curitiba, Brazil) *ad libitum*, and the environment was controlled on a 12-h light/dark cycle. The protocols were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [DHEW Publication No. (NIH) 86–23, Revised 1985, Office of Science and Health Reports, DRR/NIH, Bethesda, MD 20892], and

the study was approved by Ethics Committee on Animal Experimentation from the Universidade Estadual de Londrina, Brazil (ref. 8288). Under deep ketamine hydrochloride (Dopalen®)/xylazine hydrochloride (Anasedan®) anesthesia (150/30 mg/kg i.m.), either sterile saline (0.3 mL/100 g body weight) or papain ([1.25 IU; Sigma-Aldrich™, St. Louis, MO, USA] in 0.3 mL of sterile saline) was instilled intratracheally, according to the procedure described by Mattson et al (2002a) with modifications described by Tonon et al (2013). The 4 animal groups were labeled as follows (according to the experimental time of euthanasia after emphysema induction): animals instilled with saline and euthanized at 60 days (control-saline CS60); animals instilled with saline and euthanized at 180 days (control-saline CS180); animals instilled with papain and euthanized at 60 days (emphysema E60), and animals instilled with papain and sacrificed at 180 days (E180). After surgery for saline or papain instillation, the animals were returned to their cages. Their appearance and body weights were monitored daily for the first 2 weeks and once a week thereafter, for 60 or 180 days.

Tissue collection and preparation

Sixty or one hundred and eighty days after intratracheal instillation, the hamsters were weighed and euthanized by cervical dislocation. The middle lobe of the right lung was collected and fixed in 10% paraformaldehyde (24 h) and embedded in histological paraffin for morphometric evaluation to verify emphysema establishment.

The gastrocnemius muscle was excised, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -86°C until use. For proteolysis assay, the muscle was pulverized before frozen in liquid nitrogen and stored at the same temperature. The gastrocnemius muscle has previously been demonstrated as a good indicator of alterations in the skeletal muscle of emphysemic hamsters (MATTSON; DELP; POOLE, 2004). For the oxidative stress analysis, muscles from CS60, CS180, E60 and E180 were prepared as described above. Tissues were placed on ice and homogenized in an Ultraturrax homogenizer (Marconi® MA102 MINI; Piracicaba; SP; Brazil) with the adequate buffer and concentration for each technique. Additionally, the cachexia index was determined (considering initial and final body weight of the

emphysemic animals and body weight gain in the CS group) in order to identify a pattern of general wasting (adapted from GUARNIER et al., 2010). Blood samples were collected with sodium heparine by cardiac puncture to determine tumor necrosis factor alfa (TNF- α) and interleukin 1 beta (IL-1 β) levels. Samples were centrifuged at 1100 \times g, and plasma were immediately frozen at -20°C .

Morphometric analysis

The middle lobe of the right lungs were fixed in paraformaldehyde for 24 h and embedded in paraffin for histological studies. Paraffin-embedded tissues were semiseriably sectioned into cuts of 5 μm (5 cuts/slide interval of 50 μm /cut). After this procedure, slides were stained with haematoxylin and eosin. To verify emphysema establishment, alveolar destruction was determined by the number of times that a predetermined group of coherent lines (1.25 mm² of area and 1.50 mm of total length) crossed the parenchymal structures. The group identifications were covered, and lung images were captured (three non-coincident fields/section) using an optical microscope (100 \times magnification; OlympusTM BX43 System Microscope; Tokyo, Japan). Images were obtained using a high-resolution camera (OlympusTM Q color 3 Imaging System; Tokyo, Japan) coupled to the microscope. The baselines were then superposed onto the images; the less the structures were crossed, the more extensive was the lesion (adapted from FUSCO et al., 2002). Additionally, to verify if the number of captured fields was enough, a coefficient of variation was calculated, with acceptable values being below 20%. All sets of measurements by animal were considered acceptable. The mean of the 30 values from each animal was calculated. These values, named crossed alveolar intercepts (CAI), were used to represent each animal in the group comparison.

Oxidative Stress Parameters

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Assay – The chain reaction of lipid peroxidation produces malondialdehyde (MDA) which reacts with thiobarbituric acid (TBA) to generate a coloured product, a (TBA)₂-MDA adduct. TBARS levels were measured as described by Oliveira and Cecchini (2000), by using 10 mg/mL of total muscle homogenate in 10 mM KH₂PO₄ 10mM pH 7.4. The

absorbance was read in a spectrophotometer at 535 nm (UV-1650PC; Shimadzu, Kyoto, Japan). The values were expressed in nmol/g protein.

Carbonyl protein content – The carbonyl protein content was measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method according to ALAMDARI et al (2005). Samples were diluted in phosphate-buffered saline (PBS; 5ug protein/mL) and adsorbed to wells of a 96-well microtiter plate and then reacted with dinitrophenylhydrazine (DNPH). The protein-conjugated DNPH was probed by an anti-DNP primary antibody produced in rabbit (Sigma™, D-9656; St. Louis, MO, USA), and then a second antibody conjugated with horseradish peroxidase (anti-rabbit IgG secondary antibody HRP produced in goat- Sigma™, A-0545; St. Louis, MO, USA) was added for quantification. Peroxidase was revealed using o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD - Sigma-Aldrich™, P-5412; St. Louis, MO, USA), the absorbance was read at 490 nm using a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific™, Waltham, USA) and the results were expressed in nmol carbonyl proteins.

Total (GT), reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathiones – Redox balance was determined by the levels of GT, GSH and GSSG in muscle homogenate supernatant (50mg/mL in 10mM KH₂PO₄ pH 7.4). The reactions were based on titration with 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), which results in formation of a yellow colour. Oxidized glutathione (GSSG) was determined by previous incubation with 4-vinylpyridine for 60 min at room temperature, according to the method described by Tietze (1969). Reduced glutathione (GSH) was calculated by subtraction of the GSSG value from the total glutathione. The kinetic curves were measured at 412 nm with a UV-visible spectrophotometer (UV-1650PC; Shimadzu, Kyoto, Japan). The results were expressed in μmol/g protein.

TNF- α and IL-1β

Plasma levels of TNF- α and IL-1β were measured by using an ELISA kit (BD Biosciences™, San Diego, CA; USA; 555212 and 557953, respectively) according to the manufacturer's instruction.

Advanced Oxidation Protein Products (AOPP)

To evaluate the presence of oxidized protein formation from a possible inflammatory response in the muscle, AOPP levels were measured as described by Witko-Sarsat *et al* (1996) with some adaptations. Briefly, 40 mg/mL muscle homogenate was prepared in PBS and centrifuged at 5,000g at 4°C for 10 min. Supernatant samples or chloramine-T standard solutions (200µL) were placed in the appropriate wells of a 96-well microtiter plate, 10µL of 1.16 M KI and 20µL of acetic acid were added to each well. The absorbance of the reaction mixture was immediately read in a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific™, Waltham, USA) at 340 nm against a blank well containing 200µL of PBS, 10µL of KI and 20µL of acetic acid. AOPP levels were calculated using a chloramine-T calibration curve (Sigma-Aldrich™) and results expressed in µmol/L chloramine T.

Citrate Synthase Activity

Citrate Synthase (CS) activity was determined by using 15 mg/mL of total muscle homogenate in KH_2PO_4 50mM pH 7.4 + 1mM EDTA according to the methods described by Mattson; Poole (1998) adapted from Reichmann *et al.*, (1985) with modifications. Readings were taken at 412 nm, 15 points to every 10 seconds (10 s interval for 2,5 min) using a microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, USA). Enzyme activities were expressed as µmol/min/g protein.

Chymotrypsin-like proteolytic activity

Chymotrypsin-like proteolytic activity in the gastrocnemius muscle was measured using a Proteasome Glo™ Chymotrypsin-like Assay kit (Promega™, Madison, WI, USA Cat n° G8621) according to Tonon *et al* (2013). This kit estimates the activity of the 20S proteasome. The assay involves the use of a specific luminogenic substrate (succinyl-leucine-valine-tyrosine-aminoluciferin) to determine chymotrypsin-like activity. The proteasome cleavage of the substrate produces a luminescent signal by the luciferase contained in the reaction medium. 25 mg/mL muscle homogenate was prepared in 10mM KH_2PO_4 , pH 7.4. The samples were incubated with the same volume containing the luciferase substrate. Cleavage of the labelled substrate allowed the proteasome barrel to release amino-

luciferins, which generate light that can be captured in a luminometer. The light emission is considered proportional to the proteolytic activity of the muscle. The luminescent signal was detected with a Glo-Runner microplate reader luminometer (Turner DesignsTM), and the results were expressed as relative light units (RLU)/g protein.

Protein concentration

The protein concentration was determined in muscle homogenates by Lowry et al (1951) method with modifications as described by Miller (1959) using a microplate reader. Readings were taken at 660 nm. This method involved the use of bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Statistical Analysis

The results were shown as means \pm SEM for eight animals. Comparisons between animals characterization were made by Student's t test. TBARS, Carbonyl proteins, GT, GSH, GSSG, TNF- α , IL-1 β , AOPP, CS activity and chymotrypsin-like activity of the gastrocnemius muscle were compared by one-way ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparison test. Shapiro-Wilk normality test were used before all analysis. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Emphysema condition

The extent of lung damage in each group was evaluated by the number of CAI. A previous pilot study demonstrated no lung damage in the saline-treated group (CS) relative to a control (no saline or papain instillation – data not shown). The E60 and E180 groups had significantly lower CAI values (48.63 ± 2.24 and 48.23 ± 1.40 CAI, respectively) than the CS60 and CS180 (69.18 ± 1.64 and 66.8 ± 1.62 respectively; $p < 0.0001$ in both comparisons). We did not find significant differences in CAI between E60 and E180 ($p = 0.880$). Representative images of lung injury are presented in Figure 1 and the respective CAI values are demonstrated in Table 1,

that also shows body and muscle weight loss parameters in emphysema-induced hamsters. The final body weight was considered different in the comparison between E180 and CS180 (123.19 ± 3.04 and 148.63 ± 3.61 g respectively $p < 0.0001$). The cachexia index that considers in its calculus the body mass gained by the control group, was $4.77 \pm 1.05\%$ in the E60 group and $17.61 \pm 2.15\%$ in the E180. When comparison is made between the two papain groups, the cachexia index was significantly higher in E180 ($p < 0.0001$). There was no difference in gastrocnemius weight between CS60 and E60 but a significant decrease in gastrocnemius weight in E180 group was observed (CS180: 0.2275 ± 0.006 and E180: 0.197 ± 0.005 g $p = 0.0007$). This decrease was also significant when the comparison was made between E60 and E180. This alterations represented 13,21% of muscle weight loss in E180 when compared with C180.

Oxidative stress parameters

TBARS (Figure 2A) did not show significant differences between groups. Figure 2B shows significantly increased protein carbonyl levels in E60 (1.019 ± 0.08 nmol carbonyl proteins) when compared to CS60 (0.6929 ± 0.06 nmol carbonyl proteins $p < 0.05$). E60 also demonstrated higher levels of protein carbonyls than E180 (1.019 ± 0.08 and 0.4201 ± 0.02 nmol carbonyl proteins, respectively $p < 0.0001$).

Figure 3 demonstrates the differences in muscle redox balance between groups. Total glutathione levels (figure not shown) showed significant decrease in E60 (1.316 ± 0.08 mM/g protein) when this group was compared to its control (2.133 ± 0.06 mM/g protein $p < 0.0001$). There were no significant differences between CS180 and E180. However, when the comparison is performed between two papain groups, E180 GT levels (2.419 ± 0.10 mM/g protein) showed higher values than E60 (1.316 ± 0.08 mM/g protein $p < 0.0001$). The same statistical differences could be observed when GSSG and GSH levels were evaluated (Figure 3). Lower levels of GSSG (Figure 3A) and GSH (Figure 3B) were found in the comparison between E60 and CS60 (0.06308 ± 0.01 and 0.1586 ± 0.009 mM/g protein $p < 0.01$; 1.255 ± 0.08 and 1.974 ± 0.05 mM/g protein, respectively $p < 0.0001$) and GSSG and GSH higher levels were found for E180 when comparison was made between two papain groups

(E60: 0.06308 ± 0.01 and E180: 0.1917 ± 0.01 / E60: 1.255 ± 0.08 and E180: 2.228 ± 0.10 mM/g protein; respectively $p < 0.0001$).

Chymotrypsin-like activity

Figure 4 shows chymotrypsin-like proteolytic activity in muscle homogenates. Chymotrypsin-like activity did not differ between E60 (74391 ± 15600 RLU/mg protein) and C60 (49517 ± 9879 RLU/mg protein) or when E180 was compared with C180 (86977 ± 16077 and 132466 ± 17828 RLU/mg protein respectively). However, when the comparison is performed between two control groups, C180 chymotrypsin-like activity was higher than C60 group (132466 ± 17828 and 49517 ± 9879 RLU/mg protein respectively).

TNF- α and IL-1 β levels were not detectable. Citrate Synthase activity and AOPP levels did not show any significant differences between the groups in all comparisons as demonstrated in Table 2.

Discussion

In the present study, decreased number of CAI was found on both emphysema groups, which was important to verify emphysema establishment. In line of this, CAI values for both emphysema groups were not different, that reflects, in this case, a pathologic condition that was not progressive with time. This result were in accordance with a study published by Fusco *et al* (2002), where they reported that lung parenchyma destruction caused by papain stabilizes at 40 days.

Total body weight and gastrocnemius muscle weight at the end of experiment were decreased only in E180 group. There was a 13.21% decrease in gastrocnemius weight when it was compared to CS180 and a 26.24% decrease when two emphysema groups were compared to each other. Previous studies had already shown no gain in body weight and a decrease in gastrocnemius weight in elastase-induced emphysema in mice, after 34 weeks of induction, or with papain, 3 weeks after the induction. (FERMOSELLE; SANCHEZ; BARREIRO, 2011; MACHADO *et al.*, 2014). In COPD patients, it is possible to observe weight loss,

measured by BMI (body mass index), and its association with muscle weight loss (FERMOSELLE et al., 2012; VERHAGE et al., 2011). Cachexia derived from pulmonary disease increases mortality and it is associated with poor quality of life and loss of peripheral and respiratory muscle function (SCHOLS et al., 2005). The prevalence of cachexia in COPD is about 20-40% depending on definition of the stage's disease (VON HAEHLING; ANKER, 2010) and appears most prevalent in emphysema phenotype. In this study, E60 group presented a 4.77% of cachexia index and E180 a significantly higher cachexia index (17.61%). Besides two emphysema groups were affected by the same pulmonary injury, a clear distinct set of progressive deleterious effects on muscle can be noticed, at least, in this model.

Some studies have consistently shown mitochondrial dysfunction in COPD patients (GOSKER et al., 2007) with low body muscle mass index (RABINOVICH et al., 2007) and in inspiratory muscles of these patients (RIBERA et al., 2003). There are increasing evidences that demonstrate reduction on locomotor muscle oxidative capacity mainly measured by citrate synthase (CS) activity, in quadriceps femoral (JAKOBSSON; JORFELDT; HENRIKSSON, 1995) and vastus lateralis muscle of COPD patients (MALTAIS et al., 2000; MALTAIS et al., 1996; PUENTE-MAESTU et al., 2009). On the other hand, one study with vastus lateralis muscle in moderate-to-severe COPD patients (GREEN et al., 2008), did not show changes in maximal CS activity. In the present study, CS activity did not show statistically significant changes between all groups. Our results were in accordance with Powl et al (2000), Gea et al (2001) and Gosker et al (2009). Powl et al (2000) did not find any differences in CS, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase or in some glycolytic enzymes in anterior tibialis muscles from severe COPD patients. Gosker et al (2009) demonstrated decreased CS activity only in soleus and tibialis anterior muscles but they did not find this decrease in gastrocnemius or plantaris muscles of COPD mice induced by cigarette smoke exposure. It seems like different muscles with different structures and functions, and different models of COPD differently affect muscles oxidative capacity.

As the animals pass through a surgical process, we decided to evaluate parameters related to inflammation process, since, particularly TNF- α and IL-1 β is closely related to loss of body and muscle mass in various diseases. But unfortunately, TNF- α and IL-1 β plasma levels were not detectable. Additionally, AOPP muscle levels were measured to evaluate the presence of oxidized protein formation from a possible inflammatory response in the muscle. We did not find any

differences in AOPP levels between groups. Barreiro et al (2010) had already shown that TNF- α and IL-6 levels were the same in guinea pigs chronically exposed to cigarette-smoke and in patients with COPD. Therefore, our results suggest that in emphysema-induced animals through a singular intratraqueal instillation of papain, inflammation process is not likely to interfere on muscle oxidative modifications. It was previously speculated that inflammation process was one of the major sources of reactive species generation on skeletal muscles in this disease (MACNEE, 2006; MATTSON; SUN; et al., 2002), but it seems that the major role of inflammation process occurs during exacerbation phase of COPD (BARREIRO et al., 2008; CRUL et al., 2007; STANOJKOVIC et al., 2011) .

Oxidative stress has been significantly related to pulmonary emphysema (COUILLARD et al., 2002; COUILLARD et al., 2003; GOSKER et al., 2005; TONON et al., 2013; VAN HELVOORT et al., 2006). It is often associated with negative consequences to the patients muscles and poor quality of life. Malondialdehyde (MDA) and carbonyl proteins are among the oxidative stress markers most frequently used in the literature. MDA is one of the end-products of both enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation reactions. Mattson *et al* (2002) demonstrated increased levels of MDA on gastrocnemius muscle of hamsters with elastase-induced emphysema. Fermoselle; Sanches; Barreiro (2011) showed no differences between MDA levels between control and emphysema groups in gastrocnemius muscle of male A/J mice. In the present study, MDA levels in gastrocnemius of both experimental times were not different. Yan et al (1996) had already demonstrated lipid peroxidation products (including malondialdehyde and hidroxy nonenal) as one of the main causes of protein carbonylation. That fact makes sense, in this study, when higher E60 carbonylation levels were found while there was an absence of difference in MDA levels.

Protein carbonyls are known for their stability, when they are compared with another oxidative stress parameters, like MDA and GSSG (PANTKE et al., 1999). Because of this characteristic, they are considered sufficient biomarkers for investigations of oxidative protein damage and therefore, widely used to investigate protein oxidative modification occurrence (DALLE-DONNE et al., 2003; HOHN; KONIG; GRUNE, 2013; REQUENA et al., 2003). Marin-Corral et al (2009) studied moderate and severe COPD patients and their results showed increased diaphragm carbonylation levels only in severe COPD patients (compared to healthy control

group). Barreiro et al (2010) found increased carbonylation levels on vastus lateralis muscles of severe COPD patients when compared to healthy patients and to smokers (without COPD). When disease severity was not taken into account, like in one study performed by Barreiro et al (2003), MDA levels were increased instead of carbonylation levels on vastus lateralis (BARREIRO et al., 2003). It seems that disease severity has influence on the lipid peroxidation over carbonylation.

Additionally, we verified increased carbonyl levels in E60 when it was compared to CS60. This fact was accompanied by decreased GSH levels at this experimental time. It was already demonstrated the relationship between GSH and carbonyl levels. Bizzozero et al (2006) demonstrated that, once GSH was depleted, there was a 2-3 fold increase in carbonylation levels in mice brain tissue. In this study, at 180 days, it was observed a recovery of GSH levels, with proximity to control levels at 60 days, and, at the same experimental time, carbonyl levels were decreased. It appears that there was an adaptation by 180 days. But, it is important to notice that there was not an increase in GSSG levels when E60 GSH levels were higher than C60 GSH levels. It is reasonable to consider the possibility that glutathione thiol group had suffered other reactions, like formation of protein cysteinyl mixed disulfides with GSH (protein-S-glutathionylation) (DEPONTE, 2013; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

In general, proteins can be degraded by some systems, like ubiquitin-proteasome, apoptosis or autophagy. Particularly, oxidized proteins can be degraded by lysosomal or proteasomal degradation depending on its unfolding intensity (HOHN et al., 2013). Ubiquitin-proteasome system has been considered one of the most important proteolytic systems involved on contractile proteins degradation (LECKER et al., 1999; LLOVERA et al., 1995) and some studies have shown its involvement in COPD muscles breakdown (CRUL et al., 2010; DOUCET et al., 2007; OTTENHEIJM et al., 2006; PLANT et al., 2010; PUIG-VILANOVA et al., 2015).

Moderately oxidized, completely unfolded proteins with exposed hydrophobic structures are the ideal substrates for the 20S proteasome, considered the "core" particle (PACIFICI; KONO; DAVIES, 1993). Fermoselle et al (2012) demonstrated an increase in total protein ubiquitination levels, enzyme E3 ligase atrogin-1, FOXO-1 transcription factor and protein content of p65 factor (NF κ B family member) in vastus lateralis of muscle-wasted patients compared with control subjects.

In the present study, 20S chymotrypsin-like proteasomal activity were evaluated. It can be observed chymotrypsin-like increased levels for C180 when it was compared with C60 group. Heinz-Karl et al (2010) had already demonstrated that chymotrypsin-like and trypsin-like activities differs between male mice muscles. While quadriceps femoris muscles had time-dependent decrease levels for these two activities, in that study, soleus muscles had an increase in time-dependent levels. Then, although there is consistent evidence that proteasomal activity decreases with aging, partially because accumulation of aggregates, in a shorter space of time, this may not necessarily happens. Besides there was not significant differences between C180 and E180, in this study, there was 34.34% decrease in chymotrypsin-like activity for E180. Besides that, one fact is interesting when we analyze this result. There is no difference between chymotrypsin-like levels when E60 is compared with E180. Their levels were very close. C180 levels increased in a time-dependent manner, but E180 did not show this increase. Thus, we can consider that proteasome has its activity diminished in time, at 180th day, on emphysematous hamsters. This can lead to the idea that another type of oxidative modification may have occurred at this time-point. It is known that chronic oxidative stress situations can lead to lipofuscin formation (JUNG; BADER; GRUNE, 2007) and this structure has the ability to inhibit proteasome and lysosomal proteases (SITTE et al., 2000). In this situation, as a result, detection and degradation of oxidatively modified proteins in the cell are impaired.

We could observe that emphysema-induced animals presented no difference in carbonyl protein levels at 180 days and chymotrypsin-like activity of this animal group did not follow the increase found in C180, when they were compared to control group (C60). But, at the same time, there was a 26.24% decrease in gastrocnemius weight (E60XE180) and 17.61% of cachexia index. It is reasonable to suppose that another pathway or mechanism besides proteasomal activity induction, like aggregates formation may be occurred, and then carbonyl levels would not be detectable and proteasomal activities would be impaired.

It is clear that, by 60 days there was a significant presence of oxidative stress in the muscle, but this did not reflect significant alterations of muscle characteristics at this experimental time. However, by the 180 days, we could observe a recovery of oxidative redox balance parameters, a decrease in

carbonylation levels, and unlike in E60, we could verify significant alterations of muscle characteristics.

These data indicates that skeletal muscle adapts strongly influenced by the time of exposure to disease since the pulmonary injury does not progress. Loss of muscle mass as a late complication of COPD that develops even in the absence of disease progression. This is an important fact that should be considered in models of pulmonary emphysema induced in animals.

REFERENCES

- ALAMDARI, D. H. et al. High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 10, p. 1362-7, Nov 15 2005.
- ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 3, p. 463-99, Feb 1 2000.
- ANDRADE, F. H. et al. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. **J Physiol**, v. 509 (Pt 2), p. 565-75, Jun 1 1998.
- BARREIRO, E. et al. Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 29, n. 6, p. 771-8, Dec 2003.
- BARREIRO, E. et al. Protein carbonyl formation in the diaphragm. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 32, n. 1, p. 9-17, Jan 2005.
- BARREIRO, E. et al. Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD. **Thorax**, v. 63, n. 2, p. 100-7, Feb 2008.
- BARREIRO, E. et al. Cigarette smoke-induced oxidative stress: A role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 182, n. 4, p. 477-88, Aug 15 2010.
- BERNARD, S. et al. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 158, n. 2, p. 629-34, Aug 1998.
- BIZZOZERO, O. A. et al. Acute depletion of reduced glutathione causes extensive carbonylation of rat brain proteins. **J Neurosci Res**, v. 83, n. 4, p. 656-67, Mar 2006.
- CELLI, B. R.; MACNEE, W.; FORCE, A. E. T. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. **Eur Respir J**, v. 23, n. 6, p. 932-46, Jun 2004.
- COUILLARD, A. et al. Evidence of local exercise-induced systemic oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients. **Eur Respir J**, v. 20, n. 5, p. 1123-9, Nov 2002.
- COUILLARD, A. et al. Exercise-induced quadriceps oxidative stress and peripheral muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 167, n. 12, p. 1664-9, Jun 15 2003.
- CRUL, T. et al. Gene expression profiling in vastus lateralis muscle during an acute exacerbation of COPD. **Cell Physiol Biochem**, v. 25, n. 4-5, p. 491-500, 2010.
- CRUL, T. et al. Markers of inflammation and disuse in vastus lateralis of chronic obstructive pulmonary disease patients. **Eur J Clin Invest**, v. 37, n. 11, p. 897-904, Nov 2007.
- DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. **Trends Mol Med**, v. 9, n. 4, p. 169-76, Apr 2003.

- DALLE-DONNE, I. et al. Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant signs of severe functional impairment. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 9, p. 1075-83, Nov 1 2001.
- DALLE-DONNE, I. et al. Actin Cys374 as a nucleophilic target of alpha,beta-unsaturated aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 5, p. 583-598, Mar 1 2007.
- DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3217-66, May 2013.
- DOUCET, M. et al. Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n. 3, p. 261-9, Aug 1 2007.
- ENGELEN, M. P. et al. Skeletal muscle weakness is associated with wasting of extremity fat-free mass but not with airflow obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 733-738, Mar 2000.
- FEDOROVA, M. et al. Quantitative evaluation of tryptophan oxidation in actin and troponin I from skeletal muscles using a rat model of acute oxidative stress. **Proteomics**, v. 10, n. 14, p. 2692-700, Jul 2010
- FERMOSELLE, C. et al. Does oxidative stress modulate limb muscle atrophy in severe COPD patients? **Eur Respir J**, v. 40, n. 4, p. 851-62, Oct 2012.
- FERMOSELLE, C.; SANCHEZ, F.; BARREIRO, E. Reduction of muscle mass mediated by myostatin in an experimental model of pulmonary emphysema. **Arch Bronconeumol**, v. 47, n. 12, p. 590-8, Dec 2011.
- FUSCO, L. B. et al. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. **Jornal de Pneumologia**, v. 28, p. 1-7, 2002.
- GOSKER, H. R. et al. Altered antioxidant status in peripheral skeletal muscle of patients with COPD. **Respir Med**, v. 99, n. 1, p. 118-25, Jan 2005.
- GOSKER, H. R. et al. Reduced mitochondrial density in the vastus lateralis muscle of patients with COPD. **Eur Respir J**, v. 30, n. 1, p. 73-9, Jul 2007.
- GOSKER, H. R. et al. Extrapulmonary manifestations of chronic obstructive pulmonary disease in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 40, n. 6, p. 710-6, Jun 2009.
- GOSSELINK, R.; TROOSTERS, T.; DECRAMER, M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 153, n. 3, p. 976-80, Mar 1996.
- GREEN, H. J. et al. Organization of metabolic pathways in vastus lateralis of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 295, n. 3, p. R935-41, Sep 2008.
- GUARNIER, F. A. et al. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor. **Muscle Nerve**, v. 42, n. 6, p. 950-8, Dec 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Oxford University Press, 2007. 704

HEUNKS, L. M. et al. Effects of emphysema and training on glutathione oxidation in the hamster diaphragm. **J Appl Physiol (1985)**, v. 88, n. 6, p. 2054-61, Jun 2000.

HOHN, A.; KONIG, J.; GRUNE, T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. **J Proteomics**, v. 92, p. 132-59, Oct 30 2013.

JAKOBSSON, P.; JORFELDT, L.; HENRIKSSON, J. Metabolic enzyme activity in the quadriceps femoris muscle in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 151, n. 2 Pt 1, p. 374-7, Feb 1995.

JUNG, T.; BADER, N.; GRUNE, T. Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1119, p. 97-111, Nov 2007.

KILLIAN, K. J. et al. Exercise capacity and ventilatory, circulatory, and symptom limitation in patients with chronic airflow limitation. **Am Rev Respir Dis**, v. 146, n. 4, p. 935-40, Oct 1992.

KORKMAZ, G. G. et al. The association of oxidative stress markers with conventional risk factors in the metabolic syndrome. **Metabolism**, v. 62, n. 6, p. 828-35, Jun 2013.

LECKER, S. H. et al. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **J Nutr**, v. 129, n. 1S Suppl, p. 227S-237S, Jan 1999.

LLOVERA, M. et al. Muscle wasting associated with cancer cachexia is linked to an important activation of the ATP-dependent ubiquitin-mediated proteolysis. **Int J Cancer**, v. 61, n. 1, p. 138-41, Mar 29 1995.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.

LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095-128, Dec 15 2012.

MACHADO, M. N. et al. Papain-induced experimental pulmonary emphysema in male and female mice. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 200, p. 90-6, Aug 15 2014.

MACNEE, W. Pathology, pathogenesis, and pathophysiology. **BMJ : British Medical Journal**, v. 332, n. 7551, p. 1202-1204, 2006.

MAHADEVA, R.; SHAPIRO, S. D. Chronic obstructive pulmonary disease * 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. **Thorax**, v. 57, n. 10, p. 908-14, Oct 2002.

MALTAIS, F. et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update on limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 189, n. 9, p. e15-62, May 1 2014.

- MALTAIS, F. et al. Oxidative enzyme activities of the vastus lateralis muscle and the functional status in patients with COPD. **Thorax**, v. 55, n. 10, p. 848-53, Oct 2000.
- MALTAIS, F. et al. Oxidative capacity of the skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 153, n. 1, p. 288-93, Jan 1996.
- MARIN-CORRAL, J. et al. Oxidised proteins and superoxide anion production in the diaphragm of severe COPD patients. **Eur Respir J**, v. 33, n. 6, p. 1309-19, Jun 2009.
- MARQUIS, K. et al. Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 166, n. 6, p. 809-13, Sep 15 2002.
- MATTSON, J. P.; DELP, M. D.; POOLE, D. C. Differential effects of emphysema on skeletal muscle fibre atrophy in hamsters. **Eur Respir J**, v. 23, n. 5, p. 703-7, May 2004.
- MATTSON, J. P. et al. Fiber composition and oxidative capacity of hamster skeletal muscle. **J Histochem Cytochem**, v. 50, n. 12, p. 1685-92, Dec 2002(a).
- MATTSON, J. P. et al. Lipid peroxidation in the skeletal muscle of hamsters with emphysema. **Pathophysiology**, v. 8, n. 3, p. 215-221, Jun 2002(b).
- MATTSON, J. P.; POOLE, D. C. Pulmonary emphysema decreases hamster skeletal muscle oxidative enzyme capacity. **J Appl Physiol**, v. 85, n. 1, p. 210-4, Jul 1998.
- MILLER, G. L. Protein Determination of Large Numbers of Samples. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 5, p. 964-964, 1959/05/01 1959.
- NAGASAWA, T. et al. Free radical-mediated effects on skeletal muscle protein in rats treated with Fe-nitritotriacetate. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 231, n. 1, p. 37-41, Feb 3 1997.
- OH-ISHI, M.; UENO, T.; MAEDA, T. Proteomic method detects oxidatively induced protein carbonyls in muscles of a diabetes model Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n. 1, p. 11-22, Jan 1 2003.
- OLIVEIRA, F. J.; CECCHINI, R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with Leishmania (L.) chagasi. **J Parasitol**, v. 86, n. 5, p. 1067-72, Oct 2000.
- OTTENHEIJM, C. A. et al. Activation of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 174, n. 9, p. 997-1002, Nov 1 2006.
- PACIFICI, R. E.; KONO, Y.; DAVIES, K. J. Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. **J Biol Chem**, v. 268, n. 21, p. 15405-11, Jul 25 1993.
- PANTKE, U. et al. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 9-10, p. 1080-6, Nov 1999.
- PLANT, P. J. et al. Cellular markers of muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 42, n. 4, p. 461-71, Apr 2010.

- POUW, E. M. et al. Muscle metabolic status in patients with severe COPD with and without long-term prednisolone. **Eur Respir J**, v. 16, n. 2, p. 247-52, Aug 2000.
- POWERS, S. K.; TALBERT, E. E.; ADHIHETTY, P. J. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 9, p. 2129-38, May 1 2011.
- PUENTE-MAESTU, L. et al. Abnormal mitochondrial function in locomotor and respiratory muscles of COPD patients. **Eur Respir J**, v. 33, n. 5, p. 1045-52, May 2009.
- PUIG-VILANOVA, E. et al. Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung cancer. **Free Radic Biol Med**, v. 79, p. 91-108, Feb 2015.
- RABE, K. F. et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n. 6, p. 532-55, Sep 15 2007.
- RABINOVICH, R. A. et al. Mitochondrial dysfunction in COPD patients with low body mass index. **Eur Respir J**, v. 29, n. 4, p. 643-50, Apr 2007.
- REICHMANN, H. et al. Biochemical and ultrastructural changes of skeletal muscle mitochondria after chronic electrical stimulation in rabbits. **Pflugers Arch**, v. 404, n. 1, p. 1-9, May 1985.
- REQUENA, J. R.; LEVINE, R. L.; STADTMAN, E. R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. **Amino Acids**, v. 25, n. 3-4, p. 221-6, Dec 2003.
- RIBERA, F. et al. Mitochondrial electron transport chain function is enhanced in inspiratory muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 167, n. 6, p. 873-9, Mar 15 2003.
- SCHOLS, A. M. et al. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Clin Nutr**, v. 82, n. 1, p. 53-9, Jul 2005.
- SCHOLS, A. M. et al. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. **Am Rev Respir Dis**, v. 147, n. 5, p. 1151-6, May 1993.
- SERRES, I. et al. Impaired skeletal muscle endurance related to physical inactivity and altered lung function in COPD patients. **Chest**, v. 113, n. 4, p. 900-5, Apr 1998.
- SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metab Rev**, v. 32, n. 3-4, p. 307-26, Aug-Nov 2000.
- SITTE, N. et al. Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. **FASEB J**, v. 14, n. 11, p. 1490-8, Aug 2000.
- STANOJKOVIC, I. et al. Pulmonary function, oxidative stress and inflammatory markers in severe COPD exacerbation. **Respir Med**, v. 105 Suppl 1, p. S31-7, Oct 2011.

- TARASEVICIENE-STEWART, L. et al. An animal model of autoimmune emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, n. 7, p. 734-42, Apr 1 2005.
- TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem**, v. 27, n. 3, p. 502-22, Mar 1969.
- TOLEDO, A. C., et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. **Eur Respir J**, v. 39, n. 2, p. 254-64, 2012.
- TONON, J. et al. Lung injury-dependent oxidative status and chymotrypsin-like activity of skeletal muscles in hamsters with experimental emphysema. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 14, p. 39, 2013.
- VAN HEES, H. et al. Proteasome inhibition improves diaphragm function in an animal model for COPD. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 301, n. 1, p. L110-6, Jul 2011.
- VAN HELVOORT, H. A. et al. Exercise-induced systemic effects in muscle-wasted patients with COPD. **Med Sci Sports Exerc**, v. 38, n. 9, p. 1543-52, Sep 2006.
- VERHAGE, T. L. et al. Associations of muscle depletion with health status. Another gender difference in COPD? **Clin Nutr**, v. 30, n. 3, p. 332-8, Jun 2011.
- VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 1, n. 1, p. 1-5, Sep 2010.
- YAN, L. J. et al. Apolipoprotein B carbonyl formation is enhanced by lipid peroxidation during copper-mediated oxidation of human low-density lipoproteins. **Arch Biochem Biophys**, v. 339, n. 1, p. 165-71, Mar 1 1997.
- WRIGHT, J. L.; CHURG, A. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. **Expert Rev Respir Med**, v. 4, n. 6, p. 723-34, Dec 2010.
- ZHANG, X. L. et al. Oxidative stress and peripheral skeletal muscle dysfunction in rats with emphysema. **Chin Med J (Engl)**, v. 123, n. 1, p. 40-4, Jan 5 2010.

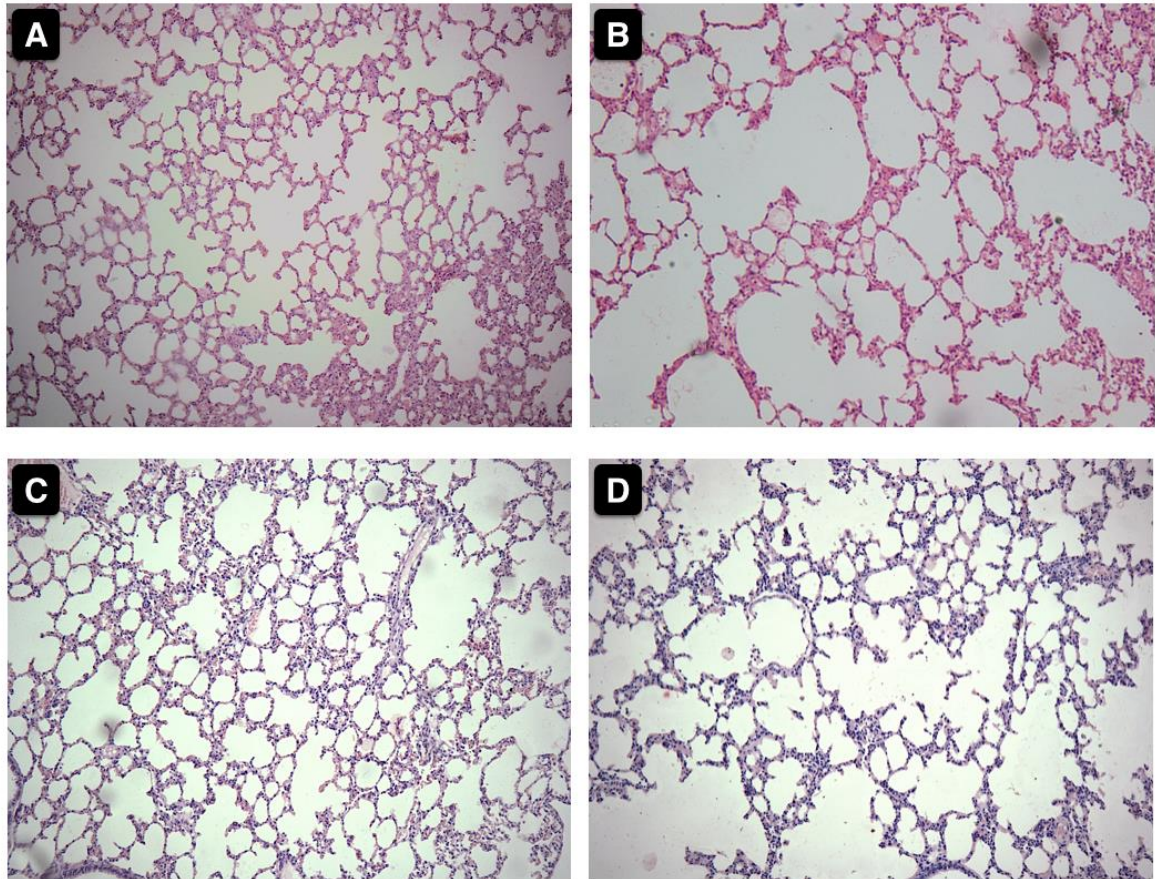


Figure 1- Histological images from lungs of hamsters treated with saline or papain. (A) Control-Saline 60 days (CS60): animals treated with 0.3 mL NaCl 0.9%; (B) Emphysema 60 days (E60): animals treated with 1.25 IU papain in 0.3 mL of NaCl 0.9% (C) Control-saline 180 days (CS180) animals treated with 0.3 mL NaCl 0.9%; (D) Emphysema 180 days (E180) animals treated with 1.25 IU papain in 0.3 mL of NaCl 0.9%. Hematoxylin and eosin, $\times 100$ amplification.

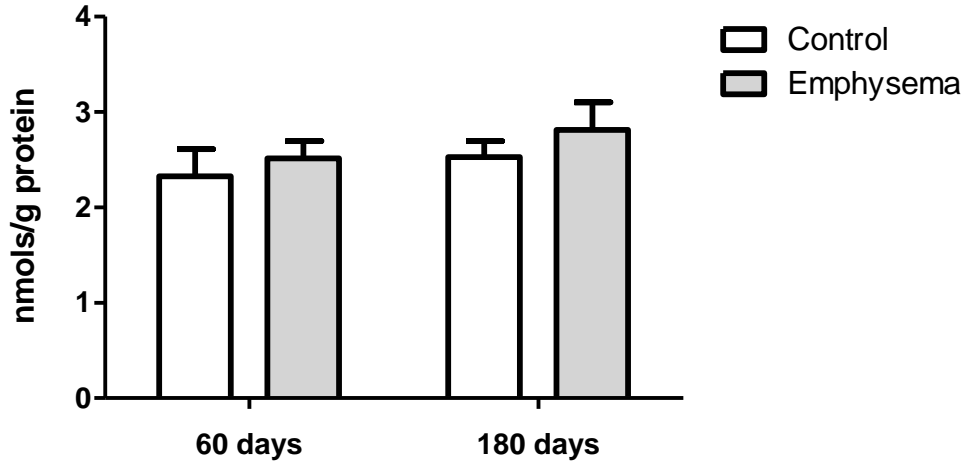
Table 1- Animal and skeletal muscle adaptation characteristics

	CS60	E60	CS180	E180
Crossed Alveolar Intercept	69.18 ± 1.64	48.63 ± 2.24 ^{***}	66.8 ± 1.62	48.23 ± 1.40 ^{***}
Inicial Weight (g)	109.43 ± 2.93	107.5 ± 2.23	107.4 ± 1.98	108.56 ± 1.71
Final Weight (g)	134.09 ± 3.87	125.8 ± 2.37	148.63 ± 3.61	123.19 ± 3.04 ^{***}
Gastrocnemius weight (g)	0.222 ± 0.01	0.267 ± 0.01	0.227 ± 0.006	0.197 ± 0.005 ^{***###}
% variation gastrocnemius	-	20.27	-	-13.21
CI (%)	-	4.77 ± 1.05	-	17.61 ± 2.15 ^{###}

Control-Saline 60 days (CS60) and Control-Saline (CS180) 60 days – Groups instilled with 0.3 mL NaCl 0.9%, euthanized by 60 or 180 days respectively. Emphysema 60 days (E60) and Emphysema 180 days (E180) – Groups instilled with papain 1.25 IU in 0.3 mL of NaCl 0.9%, euthanized by 60 or 180 days respectively. Alveolar destruction was determined by the number of times that a predetermined group of coherent lines (1.25 mm² total area and 1.50 mm total length) crossed the parenchymal structures, named crossed alveolar intercept. Cachexia index (CI) = (initial body weight – final body weight + body mass gain of CS group) / (initial body weight – body mass gain of CS group) × 100. % variation gastrocnemius was calculated considering values from CS groups. Values were expressed as means ± SEM. ^{***}= p<0.0001 compared with CS and ^{###}= p<0.0001 comparing E60 with E180 by Student's t test.

Figure 2

(A)



(B)

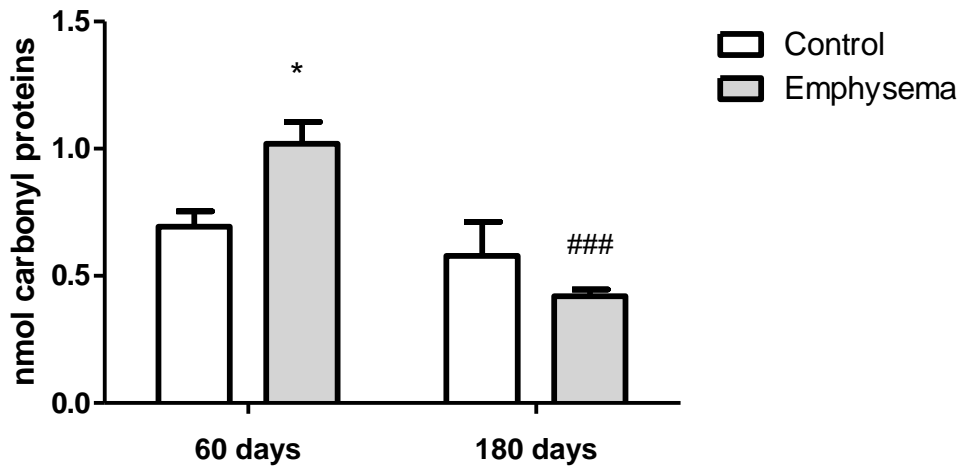
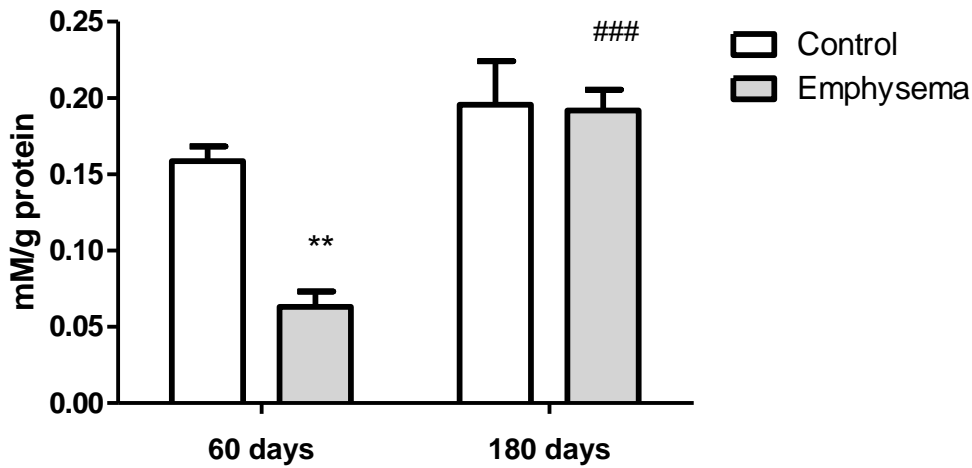


Figure 2- Effects of emphysema on oxidative stress parameters (A) Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in muscle homogenates of Control groups (intratraqueal instillation with 0.3 mL NaCl 0.9%) euthanized at 60 or 180 days (CS60 and CS180, respectively) and Emphysema groups induced by papain (intratraqueal instillation with 1.25 IU in 0.3mL NaCl 0.9%) and euthanized at 60 and 180 days (E60 and E180, respectively). (B) Protein carbonylation levels in muscle homogenates of Control groups (euthanized at 60 or 180 days) and Emphysema groups (euthanized at 60 or 180 days). The results were assessed by one-way ANOVA followed by

Bonferroni's multiple comparison test. Values are expressed as means \pm SEM.*p< 0.05 compared with CS and ###p<0.0001 comparing E60 with E180.

Figure 3

(A)



(B)

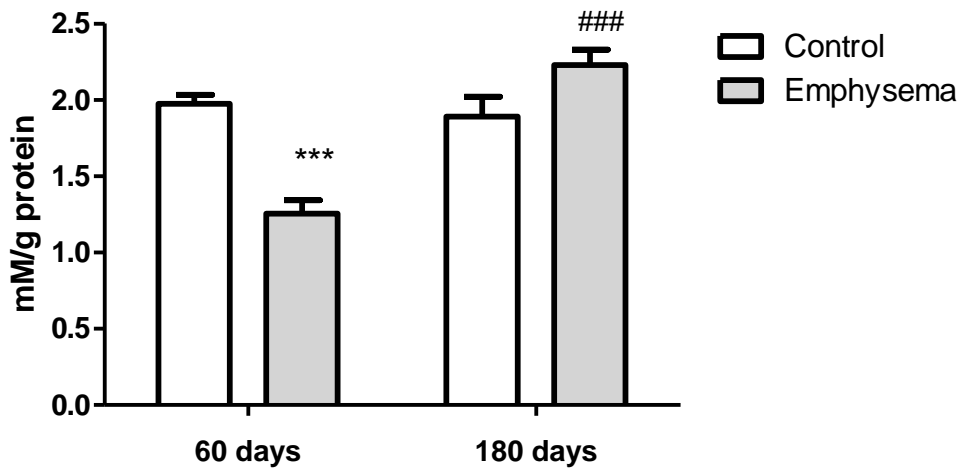


Figure 3- Effects of emphysema on muscle glutathione-redox balance in hamsters.

(A) Oxidized glutathione levels in muscle homogenates of Control groups (intratraqueal instillation with 0.3 mL NaCl 0.9%) euthanized at 60 or 180 days and Emphysema groups induced by papain (intratraqueal instillation with 1.25 IU in 0.3mL NaCl 0.9%) and euthanized at 60 or 180 days. (B) Reduced glutathione levels in muscle homogenates of Control groups (euthanized at 60 or 180 days) and Emphysema groups (euthanized at 60 or 180 days). The results were assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Values were

expressed as means \pm SEM. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0,0001$ compared with CS and ###
 $p < 0,0001$ comparing E60 with E180.

Figure 4

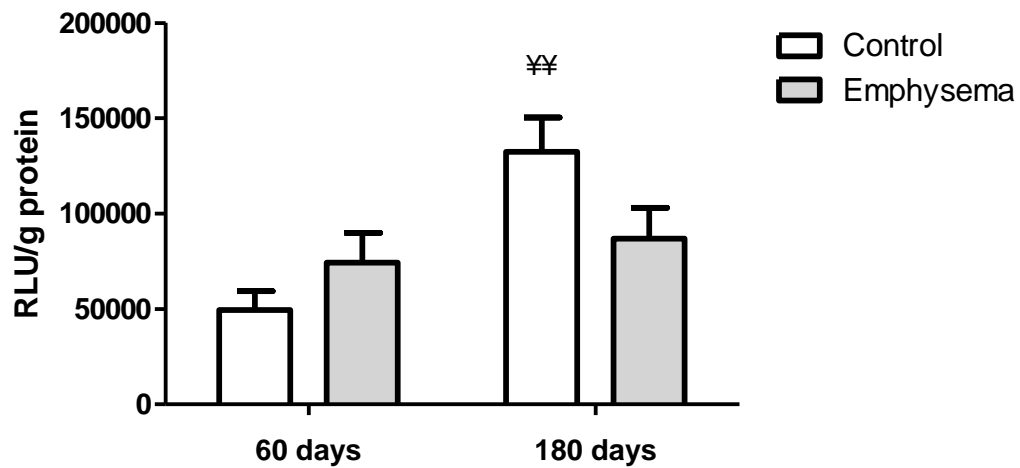


Figure 4- Proteolytic activity chymotrypsin-like on hamsters gastrocnemius with emphysema. Chymotrypsin-like activity levels in muscle homogenates of Control groups (intratraqueal instillation with 0.3 mL NaCl 0.9%) euthanized at 60 or 180 days and Emphysema groups induced by papain (intratraqueal instillation with 1.25 IU in 0.3mL NaCl 0.9%) and euthanized at 60 and 180 days. The results were assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. ¥¥ $p < 0.01$ when the comparison was performed between two control groups.

Table 2 Tissue oxidative capacity and oxidized protein formation from inflammatory process

	CS60	E60	CS180	E180
CS activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein)	85.53 \pm 8.92	64.80 \pm 6.89	72.13 \pm 6.37	93.33 \pm 4.7
AOPP ($\mu\text{mol}/\text{L}$ chloramine T)	115.8 \pm 10.86	110.8 \pm 6.79	117.9 \pm 6.74	119.4 \pm 6.59

Control-saline (CS60) and Control-saline (CS180)– Groups instilled with 0.3 mL NaCl 0.9%, euthanized by 60 or 180 days respectively. E60 and E180 – Groups instilled with papain 1.25 IU in 0.3 mL of NaCl 0.9% euthanized by 60 or 180 days respectively. Values were expressed as means \pm SEM. All analysis were performed by one way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.