



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JAIR TONON

**LESÃO OXIDATIVA NAS ADAPTAÇÕES CARDÍACAS E DA
MUSCULATURA ESQUELÉTICA EM HAMSTERS COM
DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA, INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE**

Londrina
2011

JAIR TONON

**LESÃO OXIDATIVA NAS ADAPTAÇÕES CARDÍACAS E DA
MUSCULATURA ESQUELÉTICA EM HAMSTERS COM
DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA, INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para a obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini

Londrina
2011

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T666L Tonon, Jair.
Lesão oxidativa nas adaptações cardíacas e da musculatura esquelética em hamsters com doença pulmonar obstrutiva crônica, induzida experimentalmente / Jair Tonon. – Londrina, 2011.
106 f. : il.

Orientador: Rubens Cecchini.
Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Pulmões – Doenças obstrutivas – Teses. 2. Enfisema pulmonar – Teses. 3. Estresse oxidativo – Teses. 4. Enzimas proteolíticas – Teses. 5. Miocárdio – Teses. 6. Patologia experimental – Teses I. Cecchini, Rubens. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

JAIR TONON

**LESÃO OXIDATIVA NAS ADAPTAÇÕES CARDÍACAS E DA
MUSCULATURA ESQUELÉTICA EM HAMSTERS COM DOENÇA
PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA, INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE.**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Andrea Name Colado Simão
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Helenir Medri de Souza
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni
UEM – Maringá - PR

Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Rubens Cecchini
UEL – Londrina - PR

Londrina, 20 de dezembro de 2011.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o
que ensina

Cora Coralina

Ser professor é transformar o cansaço numa
aventura maravilhosa de ensinar e aprender...
Ser professor é ter a capacidade de "sair de cena,
sem sair do espetáculo".

Autor: (Desconhecido).

Aos meus pais: Antonio e Maria, *in memoriam*.

A minha esposa: Toninha,

A meus filhos: Débora e Mateus

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rubens Cecchini, meu professor, meu orientador, meu amigo.

À minha colega Profa. Dra. Flavia Guarnier, pela importantíssima atuação em todas as fases deste trabalho.

Ao pessoal do laboratório, Sara Santos Bernardes Real Prado e Paola Eid Masetto, Cláudia Roberta Brunquell, pela valorosa colaboração na parte experimental.

Aos amigos Jesus Antonio Vargas e Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho, técnicos do Laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livres, Departamento de Ciências Patológicas, UEL, mais uma vez, por toda a imensa ajuda e companhia.

Aos docentes da Disciplina de Patologia Geral, Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini, Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz e Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri, pelo companheirismo.

Aos docentes e técnicos do Departamento de Ciências Patológicas, pela convivência fraterna.

Aos colegas de laboratório e de pós-graduação, Vânia, Carolina, Tatiane, Fernanda, Vanessa, Fernando, Raíssa, Thamara, Ana Carolina, Renato, Natalia, Lauana, Ângelo, Fabio, pela amizade.

Aos colegas do doutorado, Luís Custódio e Maria Claudia, pela amizade.

Ao corpo docente do doutorado em Patologia Experimental, pela minha formação.

TONON, Jair. **Lesão oxidativa nas adaptações cardíacas e da musculatura esquelética em hamsters com doença pulmonar obstrutiva crônica, induzida experimentalmente**. 2011, 106f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

A denominação Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) engloba uma série de doenças de diferentes etiologias que têm em comum a obstrução irreversível do fluxo aéreo. No aspecto morfológico macroscópico, o enfisema, quando bem desenvolvido, produz pulmões volumosos. Os dois mecanismos patogênicos-chave são o excesso de protease celular com baixos níveis de antiproteases e o excesso de substâncias reativas de oxigênio. A patogênese e as manifestações clínicas da DPOC não são restritas somente à inflamação e ao remodelamento estrutural, mas extendidas a uma variedade de alterações sistêmicas. Estes efeitos extra pulmonares incluem inflamação sistêmica, perda de peso não intencional, disfunção músculo-esquelética, doença cardíaca associada, e efeitos adicionais em alguns órgãos. A depleção de massa e da função musculares é reconhecida como importantes características da DPOC, contribuindo significativamente para o prognóstico. A presença de disfunção muscular na DPOC foi reconhecida em estudos que demonstraram que muitos pacientes tinham capacidade de exercício limitada e fadiga. Conseqüentemente, apareceu um novo campo de pesquisa e muitos estudos têm confirmado o papel da DPOC na disfunção músculo esquelética. Adicionalmente, a variação da massa muscular e função cardíacas, que ocorrem como conseqüência da DPOC, particularmente pela adaptação ventricular, contribui substancialmente com controle de massa periférica e do quadro de fadiga e intolerância ao exercício. Pesquisas realizadas durante os anos 1980 e 1990 indicam que Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) induzidas por aumento da atividade muscular ou pela sua inatividade, seriam citotóxicas para as fibras do próprio músculo estriado. Pesquisas mais recentes evidenciam que a produção aumentada de EROs desempenha importante papel na regulação de vias de sinalização necessárias para promover adaptação da fibra muscular em resposta a ambos: exercício e inatividade muscular. A atrofia por desuso ou em estados patológicos é um problema clínico importante. Evidências têm demonstrado que em situações fisiológicas e de adaptação ao exercício, as EROs têm atuado como moduladoras de processos de ganho de massa muscular. Várias linhas de evidências também tem implicado as EROs na perda de massa, via controle redox da proteólise. Um crescente número de estudos sugere que antioxidantes ou inibidores de ERO possam servir como agentes terapêuticos na reversão total ou parcial da atrofia, apesar de numerosas perguntas ainda permanecerem sem resposta. No que diz respeito ao músculo cardíaco, evidências levam à crença de que as EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), participam da sinalização em favor da síntese protéica e conseqüente hipertrofia muscular do músculo cardíaco. Assim, a hipótese de trabalho formulada foi a seguinte: Ocorre uma redução dos níveis de antioxidantes e aumento de EROs e da proteólise na atrofia do músculo gastrocnêmio e inversamente, aumento dos níveis de antioxidantes e diminuição de EROs e da proteólise na hipertrofia do músculo cardíaco, em modelo experimental de DPOC. Com o propósito de investigar esta hipótese, o presente

estudo foi delineado para verificar o envolvimento de EROs e proteólise no desenvolvimento da perda de massa muscular esquelética, e ganho da massa muscular cardíaca em hamsters com doença pulmonar obstrutiva crônica induzida experimentalmente. Em hamsters com enfisema induzido experimentalmente, pela instilação intratraqueal de duas doses diferentes de papaína (20 mg / mL - E20 - e 40 mg / mL - E40), nos ventrículos do coração foram avaliados: a espessura da parede, estresse oxidativo por meio do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), quimiluminescência induzida por hidroperóxido de tert-butil (QL), proteínas carboniladas, capacidade antioxidante total e proteólise. No músculo gastrocnêmio foram avaliados: peso, estresse oxidativo, atividade proteolítica proteasomal, proteínas carboniladas quimiluminescência induzida por tert-butil hidroperóxido (QL), capacidade antioxidante total, e atividade proteolítica proteasomal e peso corporal. Foi verificado, aumento de espessura das paredes cardíacas (VD-E20, 12%; VD-E40, 29%; VE-E40, 15%), das curvas de QL (de $3350,68 \pm 392,44$ em VD no grupo controle para $4696,63 \pm 1076,70$ URL/g de tecido no grupo E40, $p < 0,05$; e de $4044,77 \pm 503,39$ no VE para $5517,10 \pm 388,27$ no E20, $8169,14 \pm 1748,77$ URL / g de tecido em E40). A capacidade antioxidante total aumentou em ambos os grupos e ventrículos. Não foram detectadas diferenças nas TBARS ou proteínas carboniladas. A atividade proteolítica proteasomal, que avalia a atividade hidrolítica do barril do proteasoma, foi diminuída em ambos os grupos e os ventrículos também. Em resumo, o enfisema pode induzir mobilização antioxidante nos ventrículos direito e esquerdo, protegendo contra a formação de aldeídos de baixo peso molecular e proteínas carboniladas, conseqüentemente, inibindo a atividade proteolítica e hipertrofia. Tal resultado não foi descrito antes e merece uma investigação mais aprofundada. Com relação às doses foi observada em E20 uma coincidência de eventos: embora os valores absolutos estivessem diminuídos, não foi observada diferença estatística em geral no que diz respeito à massa corporal total ou à massa muscular, o que foi acompanhado por TBARS, proteínas carboniladas, e proteólise proteasomal. A capacidade antioxidante total foi reduzida enquanto os valores de QL aumentaram. No grupo E40, os eventos foram mais claros: enquanto a lesão pulmonar foi mais acentuada, o índice de caquexia também aumentou, enquanto houve diminuição da massa do músculo gastrocnêmio. TBARS, proteínas carboniladas, curvas QL e capacidade antioxidante total aumentaram acelerando a proteólise. Parece que, quando MDA ou aldeídos de baixo peso molecular estão presentes, o nível de proteínas oxidadas também aumenta, e a atividade proteolítica é acelerada.

Palavras-chaves: Doença pulmonar obstrutiva crônica. Enfisema. Perda de peso. Miocárdio. Estresse oxidativo. Proteólise.

TONON, Jair. **Oxidative injury in cardiac and skeletal muscle adaptations, in hamsters with chronic obstructive pulmonary disease, experimentally induced.** 2011, 106 p. Tesis (Doctoral Degree Tesis) – Londrina State University. Londrina, 2011.

ABSTRACT

The term (Chronic obstructive pulmonary disease) COPD encompasses a number of diseases from different etiologies that have in common irreversible airflow obstruction. In the macroscopic morphological aspects, panacinar emphysema, when developed, produces voluminous lungs. The two key pathogenic mechanisms are excess of cellular protease with low levels of antiproteases and excess of reactive oxygen species. The pathogenesis and clinical manifestations of COPD are not restricted only to inflammation and structural remodeling, but extended to a variety of systemic changes. These extrapulmonary effects include systemic inflammation, nutritional abnormalities, unintended weight loss, musculoskeletal dysfunction, associated with heart disease, osteoporosis, anxiety, depression, and additional effects in some organs. In recent years, there is growing interest in the clinical significance of these systemic manifestations in COPD. Cardiovascular diseases account for 50% of all hospitalizations and nearly a third of all deaths if the forced expiratory volume in one second (FEV1) - a spirometric parameter for the diagnosis of COPD - is 50% higher than predicted. COPD affects lung blood vessels, the right ventricle and the left ventricle, leading to the development of pulmonary hypertension, cor pulmonale, and consequent right and left ventricular dysfunction. Evidence also points to tricuspid regurgitation and multiple valve dysfunction. The loss of muscle mass and, consequently, function are recognized as important features of COPD, contributing significantly to the prognosis. The presence of muscle dysfunction in COPD was first recognized in studies showing that many patients had limited exercise capacity and fatigue concurrently. These findings provided an intimate knowledge that these limitations were due probably to dyspnea. Consequently, this observation opened a field of research and many studies since then have confirmed the role of skeletal muscle dysfunction in the pathogenesis of COPD. The fact that the control of the heart muscle is directly related to the issue of ventricular adaptations also refers to the fact that individuals with COPD also depends on this same mass control device for an ultimate establishment of a framework of fatigue and exercise intolerance. In addition, during the years 1980 and 1990 a stream of studies disseminated that Reactive Oxygen Species (ROS) induced by muscle activity or even inactivity would be cytotoxic to striated muscle fibers. However, more recent research evidenced that increased production of ROS plays an important role in the regulation of signaling pathways to promote adaptation of muscle fiber in response to both: exercise and muscular inactivity. The disuse atrophy or pathological states is a significant clinical problem. Evidences have shown that in physiological situations and adaptation to exercise, reactive oxygen species have been acting as modulators of processes to gain muscle mass. Several lines of evidence linking ROS and mass loss via redox control of proteolysis. A growing number of studies suggest that antioxidants or inhibitors of ROS may serve as therapeutic agents in total or partial reversion of atrophy,

although many questions still remain unanswered. With regard to the heart muscle, evidences leads to the belief that the reactive oxygen and nitrogen species, as well as the process of atrophy, participates in signaling for protein synthesis and subsequent muscle hypertrophy in cardiac muscle. The objective of this study was to investigate the involvement of reactive oxygen species in the development of skeletal muscle mass loss and gain of the cardiac muscle in hamsters with chronic obstructive pulmonary disease induced experimentally. proteins and total antioxidant capacity) and proteolysis on gastrocnemius muscles of hamsters hearts with two different doses of papain (20 mg/mL – E20 – and 40 mg/mL – E40). We observed on E20 a coincidence of events: although the absolute values were decreased, we had no statistical differences on general body weigh or muscle gastrocnemius mass, what was accompanied by TBARS, carbonylated proteins, and proteasomal proteolysis results. On the other hand, total antioxidant capacity was consumed while CL curves enhanced. On E40, the events become clearer: while the pulmonary injury becomes higher, the cachexia index enhances either, and there is decreasing of muscle mass. TBARS, carbonyl proteins, CL curves and total antioxidant capacity becomes higher, accelerating the proteolytic status. It seems that, when MDA or low molecular weight adducts are present, the level of oxidized proteins increases, and the proteolytic activity is accelerated.

Keywords: Cronic obstructive pulmonary disease. Emphysema. Weight loss. Myocardium. Oxidative stress. Proteolysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ácidos normal e com enfisema cetroacinar e panacinar.....	17
Figura 2 -	Patogênese do enfisema	19
Figura 3 -	A cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria animal	29
Figura 4 -	Esquema simplificado da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial	30
Figura 5 -	Representação esquemática do sistema antioxidante Enzimático	36
Figura 6 -	Estágios de iniciação e propagação da peroxidação lipídica.....	39
Figura 7 -	Ilustração da interação das quinases e fosfatases na regulação de fatores de transcrição e subsequente síntese protéica.....	42
Figura 8 -	Representação esquemática da ativação do NF-κB e sinalização da transcrição celular	45
Figura 9 -	Ilustração da liberação de miofilamentos mediada por calpaína na atrofia.....	47
Figura 10 -	Representação esquemática das vias de sinalização que levam à ativação de caspase-3	48
Figura 11 -	Representação esquemática da via proteolítica ATP-ubiquitina- proteasoma.....	49
Figura 12 -	Espécies reativas de oxigênio são capazes de ativar várias vias proteolíticas, incluindo calpaínas, caspase-3 e o sistema proteasoma no músculo esquelético.....	50
Figura 13 -	Mecanismos de sinalização na hipertrofia e na atrofia	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes tipos de radicais livres.....	31
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Algumas ocorrências naturais e comuns dos ácidos graxos	38
Quadro 2 - Isoformas de p38 e diferentes tecidos onde são expressas.....	42

LISTA DE SIGLAS

$^1\text{O}_2^\bullet$	oxigênio singlet
ANE	antioxidantes não enzimáticos
ATP	adenosina trifosfato
ATPase	adenosina Trifosfatase
Ca^{2+}	cálcio
CAT	catalase
Cu^+	cobre
Cu-Zn-SOD	superóxido dismutase cobre-zinco
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
e^-	elétron
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
ERNs	espécies reativas de notrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
Fe_2^+	Ferro II
Fe_3^+	Ferro III
GSH	glutaciona reduzida
GSH-Px	glutaciona peroxidase
GSH-Rd	glutaciona redutase
GSSG	glutaciona dissulfido
H^+	hidrogênio
H^\bullet	hidrogênio radical
H_2O	água
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
LOO$^\bullet$	radical lipoperoxil
Mn-SOD	superóxido dismutase manganês
N_2	Nitrógeno
N_2O_3	óxido nitroso
NAD$^+$	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP$^+$	nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NO	Oxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
O₂	oxigênio
O₂^{•-}	ânion superóxido
OH⁻	hidroxila
OH[•]	radical hidroxila
OMS	organização mundial de saúde
ONOO⁻	peroxinitrito
ONOOH	peroxinitrito protonado
RNA	ácido ribonucléico
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
SH	sulfidrila
SS	a pontes dissulfeto
SOD	superóxido dismutase
VE	ventrículo esquerdo.
XO	xantina oxidase

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA.....	16
1.1.1	Epidemiologia e Importância Clínica.....	19
1.1.2	Manifestações Sistêmicas na DPOC	20
1.1.3	Comprometimento Cardíaco.....	22
1.1.4	Comprometimento da Musculatura Periférica.....	24
1.2	RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	26
1.2.1	Aspectos Gerais	26
1.2.2	Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs)	30
1.2.3	Capacidade Antioxidante.....	34
1.2.4	Mecanismos de Lesão a Alvos Celulares Por Estresse Oxidativo: Lipoperoxidação e dano protéico.....	36
1.3	ESPÉCIES REATIVAS COMO MODULADORAS DE PROCESSOS BIOLÓGICOS	39
1.3.1	Regulação de Fosfatases e Quinases por ERRO.....	40
1.4	BALANÇO REDOX E SINALIZAÇÃO CELULAR	44
1.4.1	Regulação da Massa Muscular Esquelética Por ERRO	45
1.4.2	Regulação da Massa Muscular Cardíaca Por ERRO	51
1.5	MODELOS EXPERIMENTAIS DE DPOC53.....	54
2	OBJETIVOS	55
2.1	OBJETIVO GERAL	55
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
	REFERÊNCIAS	56
	ANEXOS	62
	Anexo A - Artigo 1: Oxidative stress and proteolysis on right and left entricles hypertrophy on two different severities of experimental emphysema	63
	Anexo B - Artigo 2: Oxidative status and proteasomal proteolytic activity on skeletal muscles of hamsters with two different severities of experimental emphysema	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

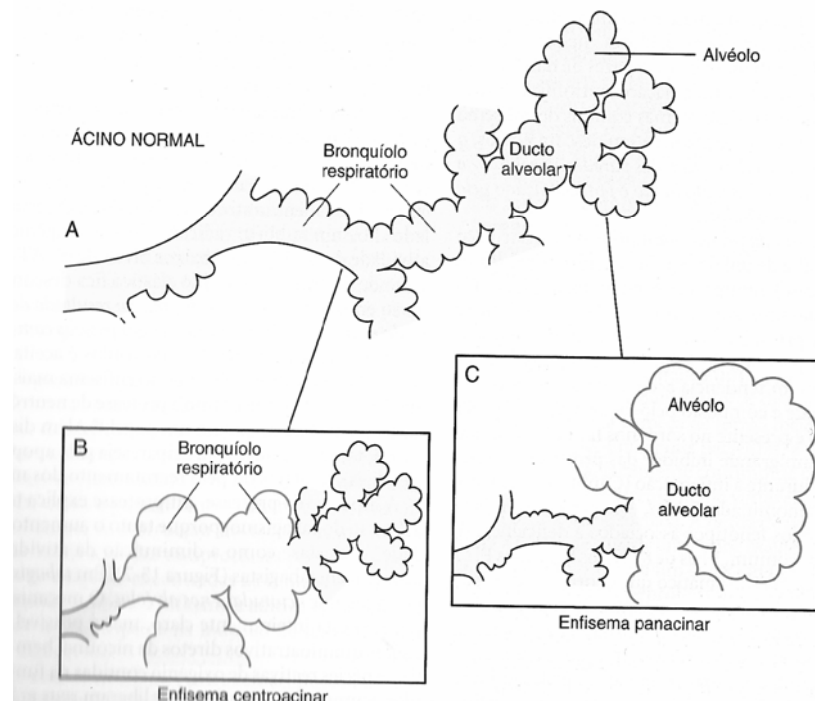
A denominação DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) engloba uma série de doenças de diferentes etiologias que têm em comum a obstrução irreversível do fluxo aéreo. A obstrução é geralmente progressiva associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões induzida por partículas, a gases irritantes, enzimas ou fatores genéticos. Dentre os pacientes com DPOC, aproximadamente 20% apresentam enfisema, enquanto os outros 80% têm bronquite crônica ou, ainda, uma combinação destas duas doenças (MONTEIRO, 2004). Além disso, pacientes acometidos de DPOC evidenciam um decréscimo no volume expiratório forçado, medido por provas de função pulmonar espirométricas. A maioria dos pacientes com enfisema sintomático é observada aos 60 anos de idade ou mais, com história antiga de dispnéia aos esforços, porém com tosse não produtiva, mínima. Os indivíduos apresentam também perda de peso e usam os músculos respiratórios acessórios para respirar (RUBIN et al., 2006).

O enfisema é uma DPOC caracterizada pelo aumento permanente dos espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais (Figura 1). Entre os subtipos estão o centro acinar (mais comum; relacionado ao tabagismo), panacinar (observado em deficiência de α_1 -antitripsina), acinar distal e irregular (RUBIN et al., 2006).

No aspecto morfológico macroscópico, o enfisema panacinar, quando bem desenvolvido, produz pulmões volumosos, que em geral se superpõem ao coração, escondendo-o quando a parede anterior do tórax é removida. As características macroscópicas do enfisema centroacinar são menos impressionantes. Os pulmões podem não parecer particularmente pálidos ou volumosos a menos que a doença esteja em estágios bastante avançados. Geralmente, os dois terços superiores dos pulmões estão afetados de modo mais acentuado (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2008). Grandes alvéolos podem facilmente ser vistos na superfície de corte dos pulmões fixados em formol. Microscopicamente, observam-se alvéolos anormalmente grandes, separados por finos septos que apresentam somente uma fibrose centroacinar focal. Vê-se o desaparecimento das fixações dos alvéolos à parede externa das pequenas vias aéreas. Com a

progressão da doença, observam-se espaços aéreos anormais ainda maiores e possíveis bolhas. Geralmente os bronquíolos respiratórios e a vasculatura do pulmão estão deformados e comprimidos pela distorção enfisematosa dos espaços aéreos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2008).

Figura 1 - (A) Diagrama das estruturas normais dentro do ácino, a unidade fundamental do pulmão. Um bronquíolo terminal (não demonstrado) está localizado em um ponto imediatamente proximal ao bronquíolo respiratório. (B) Enfisema centroacinar com dilatação que inicialmente afeta os bronquíolos respiratórios. (C) Enfisema panacinar com distensão inicial das estruturas periféricas.



Fonte: Adaptado de Kumar; Abbas; Fausto (2008).

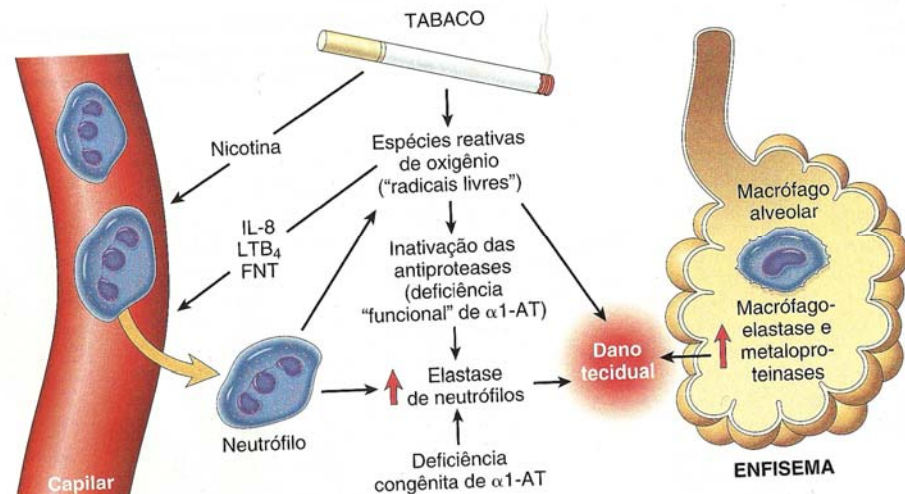
Os dois mecanismos patogênico principais são o excesso de protease celular com baixos níveis de antiproteases (desequilíbrio protease-antiprotease) e o excesso das espécies reativas de oxigênio (desequilíbrio oxidante-antioxidante). As células inflamatórias afetadas são a fonte das proteases e dos oxidantes; juntos causam lesão tecidual e inativação das antiproteases (Figura 2). Muitos indivíduos com enfisema demonstram, concomitantemente, elementos da bronquite crônica, visto que o cigarro é um fator de risco para ambos; indivíduos simplesmente com enfisema são caracterizados como “sopradoreos róseos” (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2008).

Os termos inflamação e redução do fluxo aéreo são centrais para a definição da DPOC, assim como da asma, embora diferenças marcantes entre essas duas condições devam ser reconhecidas. A inflamação na DPOC tem um padrão celular e de mediadores diferente do padrão observado na asma e apresenta, na maioria dos casos, resposta pouco expressiva aos esteróides (BARNES, 2000; BARNES et al., 2004).

Ademais, a redução do fluxo aéreo na DPOC tem um importante componente irreversível, secundário a alterações estruturais das vias aéreas, tais como a fibrose peribronquiolar e o aumento da colapsabilidade decorrente da destruição das fibras elásticas do tecido pulmonar. Essas alterações são provocadas por um complexo mecanismo iniciado bem antes das primeiras manifestações clínicas e funcionais. Desse modo, uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na etiopatogenia da DPOC permite não somente um diagnóstico mais precoce, como leva à introdução de agentes terapêuticos que modifiquem favoravelmente o curso da doença antes do desenvolvimento das alterações estruturais permanentes (MACNEE, 2005).

De maneira geral, quatro mecanismos principais são responsáveis pelas alterações funcionais observadas na DPOC: o estresse oxidativo, a inflamação, o desequilíbrio do sistema protease-antiprotease e a apoptose (MACNEE, 2005). A contribuição relativa de cada um desses mecanismos é variável e, possivelmente, explica as diferentes formas de apresentação da doença.

Figura 2 - Patogênese do enfisema. O desequilíbrio protease-antiprotease e o desequilíbrio oxidante-antioxidante são aditivos em seus efeitos e contribuem para o dano tecidual. A deficiência de α -1 antitripsina (α -1 AT) pode ser congênita ou “funcional” como um resultado da inativação oxidativa.



Fonte: Kumar, Abbas, Fausto (2008).

1.1.1 Epidemiologia e Importância Clínica

A DPOC é uma das principais causas de morte e incapacitação em todo o mundo, com mais de 16 milhões de indivíduos afetados só nos Estados Unidos (BARNES, 2004). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 80 milhões de pessoas sofrem de DPOC moderada ou grave (OMS, 2008). A doença representa, portanto, a quinta principal causa de morte no mundo e, de acordo com estimativas recentes, alcançará a terceira posição até o ano de 2030 (OMS, 2008),

No Brasil, é responsável por cerca de 30 mil óbitos/ano, sendo a quinta causa de morte mais freqüente. A prevalência em grandes centros urbanos, como a cidade de São Paulo, varia de 6% a mais de 15%, dependendo do critério diagnóstico adotado. Estima-se que haja, atualmente, três milhões de portadores da doença no país. Ao contrário de diversas doenças crônicas que estão em declínio, a progressão da DPOC é alarmante, exibindo números crescentes, mundialmente (PAULWELS et al, 2001). Segundo os registros do banco de dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS) em 2004, a cada ano são hospitalizados 280 mil brasileiros com DPOC.

O incremento na taxa de mortalidade da DPOC contrasta com a redução observada em outras enfermidades, tais como câncer, doença coronariana,

acidente vascular cerebral e aids. Essa redução é atribuída, em grande parte, a uma maior eficácia no diagnóstico e no tratamento dessas condições, parcialmente decorrente de avanços na compreensão dos seus mecanismos etiopatogênicos e de suas manifestações sistêmicas, que causam a doença incapacitante (MENEZES et al., 2005).

1.1.2 Manifestações Sistêmicas Presentes na DPOC

A patogênese e as manifestações clínicas da DPOC não se encontram restritas somente à inflamação e ao remodelamento estrutural, mas são estendidas a uma variedade de alterações sistêmicas. Estes efeitos extra pulmonares incluem inflamação sistêmica, anormalidades nutricionais, perda de peso não intencional, disfunção músculo-esquelética, doença cardíaca associada, osteoporose, ansiedade, depressão e efeitos adicionais em alguns órgãos (DECRAMER et al., 2005). Nos últimos anos, há um crescente interesse na importância clínica dessas manifestações sistêmicas na DPOC. Dentre as manifestações da DPOC encontram-se:

- **Inflamação sistêmica:** A inflamação sistêmica anormal no portador de DPOC foi observada não somente em nível pulmonar, mas também em nível sistêmico. Marcadores inflamatórios séricos (citocinas, proteína C-reativa e certos fatores de coagulação) encontram-se aumentados durante exacerbações. Muitas das manifestações sistêmicas da doença são conseqüências do processo inflamatório. Muitos mecanismos foram propostos com o objetivo de explicar este evento: os mediadores seriam capazes de alcançar a circulação sistêmica a partir do compartimento pulmonar; uma reação inflamatória secundária no tecido causada pela hipóxia; reações induzidas por lipopolissacarídeos durante as exacerbações; envolvimento da fumaça de cigarro; hiperinsuflação pulmonar; disfunção músculo-esquelética; e envolvimento da medula óssea (BARBU; IORDACHE; MAN, 2011).

- **Anormalidades nutricionais:** Muitos estudos têm demonstrado que a má nutrição ou massa corporal reduzida são comuns em indivíduos com DPOC, afetando aproximadamente 10-15% dos pacientes com doença leve a moderada, e 50% dos pacientes com doença em estado avançado e falência respiratória crônica. A base fisiopatológica da perda de massa ainda não é muito bem entendida, apesar de um índice metabólico alto, embora não compensado por

um aumento correspondente no número de calorías, parece desempenhar um papel importante. A causa do aumento da taxa metabólica basal, no entanto, é assunto de muitos debates e muitas hipóteses foram propostas. A mais aceita é a do aumento de energia com aumento no consumo de oxigênio pelos músculos respiratórios. Além disso, outros fatores também parecem ser considerados, como o uso de algumas medicações comumente utilizadas pelos pacientes, e mediadores inflamatórios como o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e a proteína C-reativa (DECRAMER et al., 2005).

- Osteoporose: A osteoporose é um achado comum em pacientes com DPOC avançada e leva ao aumento da suscetibilidade a fraturas, debilitando ainda mais esses pacientes. O uso de glicocorticoides, a deficiência de vitamina D, o tabagismo, o baixo IMC e o estilo de vida sedentário estão envolvidos na etiologia da osteoporose. A suplementação de cálcio e vitamina D nesses pacientes tem-se mostrado bastante eficiente, principalmente quando se encontram em corticoterapia (FERNANDES; BEZERRA, 2006).

- Ansiedade e depressão: Ansiedade, depressão e autoconceito depreciado podem estar presentes numa variedade de doenças agudas e crônicas. Nas últimas duas décadas, um grupo expressivo de pesquisadores investigou as associações entre ansiedade, depressão e DPOC. Ansiedade tem sido identificada em pacientes com taxas variando de 21% a 96% dos casos. Distúrbios depressivos estão presentes em 27% a 79% desses indivíduos (GODOY; GODOY, 2002). Estas manifestações podem ter sua origem na baixa qualidade de vida revelada pelos pacientes.

- Doença cardíaca associada: Doenças cardiovasculares são responsáveis por 50% de todas as hospitalizações e perto de um terço de todas as mortes se o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) – um parâmetro espirométrico para diagnóstico de DPOC – for 50% maior do que o predito. A DPOC afeta os vasos sanguíneos pulmonares, o ventrículo direito, assim como o ventrículo esquerdo, levando ao desenvolvimento de hipertensão pulmonar, hipertrofia cardíaca direita denominado *cor pulmonale*, e disfunção ventricular direita e esquerda. Evidências apontam também para regurgitação tricúspide e disfunções valvares múltiplas (GUPTA et al., 2011).

- Disfunção músculo-esquelética: A depleção de massa muscular e, conseqüentemente, a função são reconhecidas como importantes características da DPOC, contribuindo significativamente para o prognóstico. A presença de disfunção muscular na DPOC foi primeiramente reconhecida em estudos que demonstravam que muitos pacientes tinham capacidade de exercício limitada e fadiga concomitante. Estes achados sugeriram inicialmente que estas limitações se deviam, provavelmente, à dispnéia. Conseqüentemente, esta observação abriu um campo de pesquisa e muitos estudos desde então confirmaram o papel da disfunção músculo esquelética na patogênese da DPOC (DECRAMER et al., 2005).
- Tanto o comprometimento cardíaco quanto o comprometimento músculo-esquelético merecem especial atenção pelo seu envolvimento no estabelecimento da fadiga.

1.1.3 Comprometimento Cardíaco

As lesões secundárias a tecidos não pulmonares em conseqüência da DPOC têm sido investigadas, mas pouca ênfase tem sido atribuída à lesão cardíaca. A DPOC leve, moderada ou grave está associada ao risco aumentado de disfunção do Ventrículo Esquerdo (VE) principalmente em pacientes submetidos à cirurgia vascular. Em pacientes com DPOC e disfunção do VE, o risco de mortalidade é elevado quando comparado com pacientes com DPOC e função de VE normal (FLU et al., 2010).

Diversos estudos têm sido realizados para verificar os mecanismos de coexistência de DPOC e insuficiência cardíaca. Em 2005, Rutten et al. avaliaram a prevalência de insuficiência cardíaca em pacientes com DPOC, com idade acima de 65 anos, durante período de estabilidade clínica. Relataram que a insuficiência cardíaca estava presente em 20,5% dos pacientes com DPOC, e concluíram que a prevalência de insuficiência cardíaca em pacientes com DPOC pode ser quatro vezes maior do que na população geral. Macchia et al. (2007) mostraram que 1 em cada 4 pacientes com insuficiência cardíaca, também estavam em tratamento para DPOC, sendo que nestes indivíduos a sobrevivência apresentava-se reduzida. A prevalência de disfunção do VE em pacientes com DPOC pode ser aumentada porque ambas as doenças apresentam fatores de risco similares, tais como idade,

sexo masculino e tabagismo, ou por causa de inflamação sistêmica e estresse oxidativo associado às doenças crônicas pulmonares.

Monteiro et al. (2004) em um eficiente modelo de indução do enfisema pulmonar com papaína em ratos, no qual foi observada a destruição do tecido alveolar que mimetiza alterações morfológicas encontradas no enfisema pulmonar, tais lesões se estabelecem em até 60 dias após a agressão inicial, sem progressão. Neste modelo, a presença de enfisema pulmonar não provocou alterações morfológicas na parede do ventrículo direito ou septo interventricular, enquanto que a destruição alveolar induziu hipertrofia do ventrículo esquerdo e dilatação do ventrículo direito.

O termo *cor pulmonale* foi definido pela Organização Mundial de Saúde como uma síndrome, caracterizada pela hipertrofia do ventrículo direito, resultante de doenças que afetam a função e/ou a estrutura dos pulmões, exceto quando as alterações pulmonares são secundárias a doenças que afetam o lado esquerdo do coração ou a cardiopatias congênitas. Frente ao limitado uso clínico desta definição, por basear-se em um aspecto anatomopatológico, redefiniu o termo hipertrofia por alteração na estrutura e função do ventrículo direito. Essa definição ainda é imprecisa, pois engloba desde um comprometimento leve à franca falência do ventrículo direito. Têm-se proposto que o termo *cor pulmonale* seja abandonado e substituído por uma descrição mais clara, distinguindo a hipertrofia, a dilatação, a alteração funcional e a falência do ventrículo direito (OTA; PEREIRA, 1998).

Apesar de a progressão dos níveis da pressão da artéria pulmonar, na DPOC com hipoxemia e hipercapnia leve a moderada, ser lenta, em média, há um aumento de 3 mmHg/ano e raramente se atingem os níveis pressóricos encontrados na hipertensão pulmonar primária; existe uma relação de pior prognóstico, quando há hipertensão pulmonar. Há indícios de sobrevivência de 72% em quatro anos, em indivíduos sem hipertensão pulmonar contra 49% quando apresentavam hipertensão pulmonar. Talvez a presença de hipertensão pulmonar possa refletir a gravidade da doença e não necessariamente estar influenciando diretamente na sua mortalidade (OTA; PEREIRA, 1998).

O fato de o controle da massa muscular cardíaca estar diretamente relacionado à questão das adaptações ventriculares remete também ao fato de que o indivíduo com DPOC depende também deste mesmo controle de massa periférico

para um estabelecimento definitivo de um quadro de fadiga e intolerância ao exercício (OTA; PEREIRA, 1998).

1.1.4 Comprometimento da Musculatura Periférica

O músculo estriado esquelético é o tecido mais abundante no corpo humano, sendo responsável por cerca de 50% da massa corporal total. Não é somente o maior local de atividade metabólica, mas também o maior reservatório de energia, servindo como fonte de aminoácidos a serem utilizados como produção de energia durante períodos de privação alimentar, e desempenhando um papel central no fluxo de nitrogênio durante algumas doenças (NADER, 2005). Evidências têm sugerido que em muitas doenças ou condições não favoráveis, a massa de músculo estriado esquelético pode ser consideravelmente reduzida, uma condição que leva à consequências indesejáveis para o estado geral de saúde do indivíduo.

A depleção da massa muscular em pacientes com doenças inflamatórias crônicas é a maior causa da redução do tempo de sobrevida. Em pacientes com DPOC a intolerância ao exercício não está somente relacionada à redução do volume pulmonar, mas também à disfunção do músculo estriado esquelético (SCHOLS, 1993; GOSSELINK et al., 1996). No entanto, torna-se importante identificar quais fatores contribuem para a disfunção muscular e o mecanismo pelos quais ocorre a perda de massa deste tecido.

Vários são os fatores que contribuem para o referido aparecimento de fadiga e intolerância aos esforços:

- Fraqueza e perda de massa muscular: A atrofia muscular pode ocorrer quando o balanço entre síntese de proteínas e sua degradação é quebrado em favor do segundo. Algumas pesquisas também têm demonstrado existir um papel da diminuição da síntese protéica em doenças crônicas (RENNIE et al., 1983). Essas duas vias podem ocorrer em consequência da inflamação sistêmica que frequentemente acontece em pacientes DPOC. Ainda, alguns estudos indicam que a capacidade regenerativa do músculo esquelético se encontra diminuída em camundongos com nível circulante de TNF- α elevado (GUTTRIDGE et al., 2000; LANGEN et al., 2006). Além disso, níveis de testosterona, um hormônio anabólico, estão diminuídos em pacientes DPOC (CASABURI, 1998). Estes níveis mais baixos estão associados com fraqueza muscular (VAN VLIET et al., 2005). Existe

especulação a respeito de que a hipóxia crônica (AASEBO et al., 1993) e terapia com corticosteroides (KAMISCHKE et al., 1998) contribuam para os níveis baixos de testosterona. Também, estudos com miostatina, um hormônio que é produzido no músculo e diminui o crescimento muscular inibindo a atividade das células satélite, são escassos e seu papel na perda de massa muscular ainda é desconhecido (JESPERSEN et al., 2006). Outro fator que deve ser levado em consideração é a diminuição do *drive* neural aos músculos de pacientes DPOC (RUTHERFORD et al., 2006).

- Propriedades contráteis e tipo de composição das fibras: Durante a vida diária, muitas atividades requerem potência na contração muscular. No entanto, esta potência na contração, que é um produto da força e da velocidade, é mais importante durante a vida diária do que a habilidade do músculo de gerar força isométrica ou de sustentação. Esta perda de potência em pacientes com DPOC como resultado da perda de força pode ser compensada, em alguma extensão, pela mudança na composição das fibras musculares: fibras de contração lenta (metabolismo oxidativo), responsáveis por contrações sustentáveis, como por exemplo, a manutenção da postura, se transformam em fibras de contração rápida (metabolismo glicolítico), responsáveis por atividades que requerem maior potência ou contração imediata (JOBIN et al., 1998). O músculo passa também a apresentar uma proporção aumentada de fibras híbridas expressando mais de uma isoforma de miosina de cadeia pesada (GOSKER, et al., 2002). A transição de fibras parece acontecer de maneira mais exacerbada no enfisema do que na bronquite e estar relacionada com a severidade da doença (SATTA et al., 1997).

- Metabolismo e capilarização: Em estágios avançados da doença, o metabolismo energético se torna gradativamente comprometido evidenciado pelos baixos níveis de glicogênio, ATP e creatina fosfato. Estes dados foram encontrados no músculo quadríceps de pacientes com falência respiratória (JAKOBSSON et al., 1990). Poucos trabalhos têm sido feitos a respeito da capilarização. JOBIN et al. (1998) encontraram uma diminuição de quase 50% no índice capilar/fibra, e densidade capilar, sugerindo que uma perda desproporcional de capilares pode ocorrer na DPOC (WÜST; DEGENS, 2007) e pode estar relacionada com o baixo aporte de oxigênio ao tecido e, conseqüentemente, perda do mesmo.

- Fadiga muscular propriamente dita: Fadiga muscular pode ser definida como a incapacidade do músculo de manter certa força ou potência. Como mencionado, intolerância ao exercício, refletida por baixo pico no consumo de oxigênio, é um sintoma freqüente em pacientes com DPOC. Sob circunstâncias onde o sistema cardio-respiratório não seja o fator limitante, como exercícios localizados de membros inferiores, ou exercícios para um único músculo ou para um único grupo muscular, a capilarização e a capacidade oxidativa musculares são importantes determinantes de resistência à fadiga muscular (DEGENS; VEERKAM, 1994).

Juntos, todos estes fatores, tanto os cardíacos quanto os musculares, levam o indivíduo portador de doença muscular obstrutiva crônica, a um quadro conhecido como caquexia. Do grego, “kakos” - “mau” e “hexis” - “estado”, é uma síndrome associada à perda de massa muscular, à reduzida ingestão de alimento, à diminuição de atividade física e à acelerada degradação de proteínas (WALSMITH; ROUBENOFF, 2002). Está presente em muitas doenças crônicas tais como: câncer, aids, insuficiência cardíaca crônica, falência pulmonar crônica, cirrose hepática, insuficiência renal, artrite reumatoide e sepse.

Durante os anos 1980 e 1990 uma corrente de estudos disseminava que Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) induzidas por atividade muscular ou até pela inatividade seriam citotóxicas para as fibras do músculo estriado. No entanto, pesquisas mais recentes evidenciam que a produção aumentada de EROs desempenha importante papel na regulação de vias de sinalização necessárias para promover adaptação da fibra muscular em resposta a ambos: exercício e inatividade muscular (POWERS et al., 2010).

1.2 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

1.2.1 Aspectos Gerais

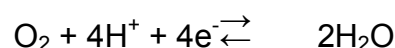
Radical livre é qualquer espécie capaz de uma existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. Um elétron desemparelhado é aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular sozinho. A presença de um ou mais elétrons desemparelhados muitas vezes torna estas espécies altamente

reativas, apesar de esta reatividade ser variável (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Muitos radicais livres existem em sistemas biológicos e podem ser formados de diversas maneiras. Fatores ambientais, como poluentes do ar, hidrocarbonetos, chumbo, mercúrio, organoclorados, paraquat, tetracloreto de carbono, e variados estados patológicos contribuem para o aumento da produção de radicais livres nesses sistemas (FREEMAN; CRAPO, 1982). As fontes de geração intracelular incluem:

- autoxidação de pequenas moléculas: uma grande variedade de moléculas de baixo peso molecular (tióis, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas), capazes de sofrer reação de oxiredução, contribuem para a produção de radicais livres no meio celular (FREEMAN; CRAPO, 1982).

- cadeia de transporte de elétrons: uma das principais fontes de geração de radicais livres em sistemas fisiológicos é o escape de elétrons que ocorre na cadeia respiratória mitocondrial durante a respiração celular aeróbia. Aproximadamente 85% do oxigênio respirado é utilizado pela mitocôndria na cadeia respiratória. Os 15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases, e também por reações químicas de oxidação direta (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Na parte terminal da cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo oxidase remove um elétron de cada uma das quatro moléculas reduzidas de citocromo c, oxidando-as a citocromo c férrico, e adiciona os quatro elétrons ao O₂ para formar água (de 95 a 98% dos 85% utilizado pela mitocôndria). Os 2 a 5% restantes são reduzidos univalentemente em metabólitos classificados entre as espécies reativas de oxigênio (Figuras 3 e 4) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). A reação, então é:



- neutrófilos e resposta inflamatória (NADPH oxidase): os neutrófilos são células importantes para a remoção de proteínas danificadas, restos celulares, reparo de tecido danificado e resposta imune contra antígenos. Quando recrutado para o foco de infecção, liberam basicamente dois fatores: lisoenzimas e ânion superóxido (O₂⁻), uma importante espécie reativa de oxigênio, produzida nesta

situação pela redução univalente do O₂ na presença de NADPH, em uma reação catalisada pela enzima NADPH oxidase, um estado chamado de *burst* respiratório (FREEMAN; CRAPO, 1982).

- membrana plasmática: a oxidação do ácido araquidônico por enzimas ligadas à membrana, como no caso das cicloxigenases, envolve a formação de radicais livres intermediários e produtos bioativos como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (MASON et al., 1980).

- retículo endoplasmático: as membranas do retículo endoplasmático contêm heme proteínas que podem oxidar ácidos graxos insaturados (CAPDEVILLA et al., 1981), drogas e substâncias xenobióticas, ao mesmo tempo que reduzem o dioxigênio (AUST; ROERIG; PEDERSON, 1972).

- peroxissomas: consideradas potentes fontes de H₂O₂ (um produto de reação radicalar ao mesmo tempo que é substrato para a formação de novos radicais livres) por concentrar grande número de oxidases (MASTERS; HOLMES, 1977).

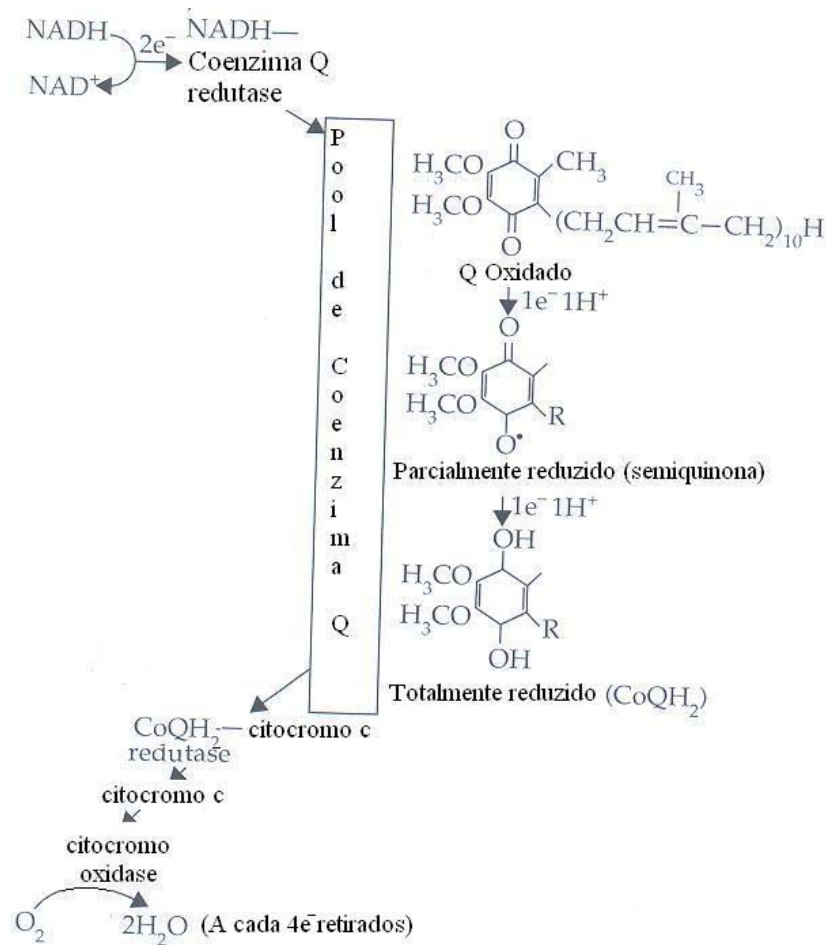
- fissão homolítica: radicais também podem ser formados quando uma ligação covalente é quebrada se um elétron de cada par da ligação permanece em cada átomo. A energia requerida para se dissociar uma ligação covalente pode vir do aquecimento, luz ultravioleta, ou radiação ionizante, por exemplo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Como os radicais livres são continuamente formados em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressores, conhecidos como antioxidantes (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). A composição das defesas antioxidantes difere de acordo com o tecido e o tipo de célula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Levando em consideração os conceitos de radicais livres e de defesa antioxidante, chegamos ao termo estresse oxidativo, que é utilizado quando o delicado balanço entre produção de radicais livres e defesa antioxidante é quebrado. Apesar de ser amplamente utilizado na literatura referente a radicais livres, este termo ainda não é muito bem definido. Sies (1991) definiu o termo como o “distúrbio no balanço pró-oxidante/antioxidante, a favor do primeiro, levando à potencial lesão”. Tal dano é frequentemente chamado de dano oxidativo. Halliwell e Gutteridge (2007) definem como “uma lesão de biomoléculas causada por ataque de

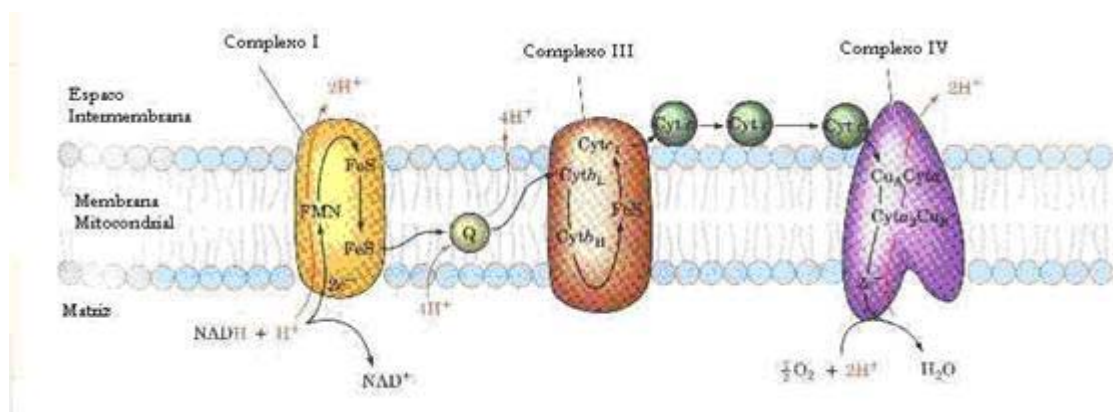
espécies reativas geradas por constituintes de organismos vivos”. Nem toda lesão causada por estresse oxidativo é lesão oxidativa. Uma lesão oxidativa aumentada pode resultar não somente de estresse oxidativo, mas também de falência nos sistemas de reparo ou substituição. Em princípio, estresse oxidativo pode resultar de: diminuição de antioxidante, ou aumento na produção de espécies reativas.

Figura 3 - A cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria animal. De forma simplificada, durante a operação da cadeia de transporte de elétrons, NADH é oxidado a NAD^+ por um multicomplexo enzimático conhecido como NADH-coenzima Q redutase (também chamado de NADH desidrogenase ou complexo I), e os dois elétrons retirados são passados à Coenzima Q10 (CoQ - ubiquinona). A enzima ácido dihidroorótico desidrogenase também alimenta elétrons na cadeia de transporte em vários pontos da CoQ10. A máquina de proteínas que transferem elétrons a partir do succinato para a CoQ10 é chamada de complexo II. A partir do Q, os elétrons passam por outro complexo multiprotéico (Coenzima Q-citocromo c redutase ou complexo III, que contém proteínas ferro-enxofre, mais citocromos b e c_1) e pelo citocromo c. Citocromos são heme proteínas que aceitam elétrons permitindo que o Fe(III) localizado no centro do seu anel seja reduzida a Fe(II) . Diferentes citocromos, designados por letras minúsculas, contêm diferentes proteínas e diferentes grupos heme. Finalmente, o citocromo c reduzido é reoxidado por outro complexo multiprotéico, citocromo c oxidase (complexo IV), que contém citocromo a, citocromo a_3 , e cobre. Para cada quatro elétrons retirados deste complexo, uma molécula de oxigênio é completamente reduzida à duas moléculas de água.



Fonte: Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2007.

Figura 4 - Esquema simplificado da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, indicando o caminho da transferência de elétrons (em preto) e a bomba de prótons (em vermelho). Elétrons são transferidos entre os complexos I e III e através da CoQ na membrana, e entre os complexos III e IV através do citocromo c da interface da membrana. O complexo II (não mostrado) transfere elétrons do succinato para a CoQ



Fonte: http://prolina.df.ibilce.unesp.br/valmir/bioquimica/cadeia_transp_e/index.html&usg=__qKrwWzi76F725UY4FGII0tboxaD4=&h=779&w=747&sz=45&hl=pt-

br&start=2&zoom=1&itbs=1&tbnid=gQE_XkbidDGNjM:&tbnh=142&tbnw=136&prev=/images%3Fq%3Dwww.df.prolina%26hl%3Dpt-br%26gbv%3D2%26tbs%3Disch:1

1.2.2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs)

Em razão de sua configuração eletrônica, o oxigênio tem forte tendência a receber um elétron de cada vez. Por este motivo, os radicais livres, na sua maioria, são derivados do metabolismo do oxigênio e são encontrados em todos os sistemas biológicos. Diversos tipos de EROs encontram-se apresentados na Tabela 1.

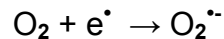
Tabela 1 - Diferentes tipos de radicais livres

Nome	Fórmula	Comentários/exemplos
Hidrogênio radical	H^{\bullet}	O radical mais simples.
Triclorometil	CCl_3^{\bullet}	Um radical carbono-centrado (o elétron desemparelhado reside no carbono). Formado durante o metabolismo do CCl_4 no fígado, contribuindo para seu efeito tóxico. Radicais carbono usualmente reagem rapidamente com O_2 formando radicais peroxil.
Superóxido	$O_2^{\bullet-}$	Um radical centrado no oxigênio.
Hidroxil	OH^{\bullet}	Um radical centrado no oxigênio altamente reativo.
Tiil/Pertiil	$RS^{\bullet}/RSS^{\bullet}$	Radicais com elétron desemparelhado residindo no enxofre,
Peroxil/Alcoxil	$RO_2^{\bullet}, RO^{\bullet}$	Radicais centrados no oxigênio, formados (entre outras rotas) durante a quebra de peróxidos orgânicos.
Radicais centrado no nitrogênio	$C_6H_5N=N^{\bullet}$	O exemplo apresentado é a fenildiazina radical, formada durante a oxidação da fenilhidrazina. Radicais centrados no nitrogênio são frequentemente usados para medir capacidade antioxidante total.
Radical clorina	Cl^{\bullet}	Produzido por fissão homolítica da clorina (p.ex. luz UV).

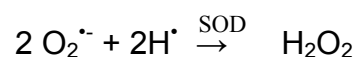
Fonte: Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2007.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) mais importantes em meios biológicos são:

- radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$): é formado em todas as células aeróbias. Cerca de 5% do oxigênio consumido é reduzido a radical ânion superóxido, uma forma muito comum de formação de radicais livres nos meios biológicos. O radical superóxido é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos no *burst* respiratório (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985). A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$):



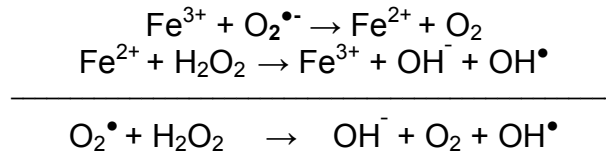
- radical hidroperoxila (HO_2^{\bullet}): representa a forma protonada do radical superóxido. Existem evidências de que o radical hidroperoxila seja mais reativo que o superóxido por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).
- peróxido de hidrogênio (H_2O_2): o superóxido, ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio, forma H_2O_2 através de dismutação. Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD).



Apesar de não ser um radical por não possuir elétrons desemparelhados, o peróxido de hidrogênio é de grande importância na lesão celular, pois na presença de metais de transição (como o Fe^{2+}), é capaz de gerar produtos mais reativos, como o radical hidroxil (pela reação de Fenton Haber-Weiss) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

- radical hidroxila (OH^{\bullet}): altamente reativo, promove a modificação de bases púricas e pirimídicas, levando à mutagênese (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Pode ainda inativar várias proteínas (enzimas e constituintes de membranas celulares) ao oxidar seus grupos sulfidrilas (SH) a pontes dissulfeto (SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Devido à sua alta reatividade, combina-se rapidamente com metais de transição ou outros radicais no próprio sítio onde é produzido. O radical hidroxila pode ser formado também através de reações na presença de metais de transição (como o Fe^{2+} e Cu^+) com o peróxido de hidrogênio, via reação de Fenton-Haber-Weiss (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989):



- oxigênio singlet ($^1\text{O}_2^\bullet$): é a forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O $^1\text{O}_2^\bullet$ tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Em função de sua aumentada reatividade com biomoléculas, as EROs em geral são capazes de alterar tamanho e forma dos compostos com os quais interagem (FISCHER, 1987).

O óxido nítrico (NO) também é considerado uma fonte de geração de Radicais Livres. Há aproximadamente 20 anos, o óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) tem sido tema de intensa pesquisa visando a compreensão de seu envolvimento em processos fisiológicos e fisiopatológicos (ZHOU; BERNHARD, 2005). Existem várias enzimas envolvidas na liberação ou na síntese de $\cdot\text{NO}$, como a nitrito redutase (CUTRUZZOLA, 1999), a xantina oxidase (XO) (MILLAR et al., 1998), e enzimas que agem sobre doadores de $\cdot\text{NO}$ (FEELISCH, 1998).

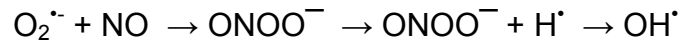
O $\cdot\text{NO}$ é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por muitos tipos celulares. A síntese ocorre a partir da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que pertence à superfamília das monooxigenases, sendo estruturalmente semelhante às isoenzimas do citocromo P450. Estas enzimas, nas formas ativas, são tetrâmeros formados por dois monômeros de NOS e dois monômeros de calmodulina (CaM). Além da CaM, estas enzimas possuem co-fatores fortemente ligados: (6R)-5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina (BH_4), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e ferro porfirina IX (heme). A NOS converte L-arginina em $\cdot\text{NO}$ e L-citrulina utilizando NADPH (POWERS; JACKSON, 2008).

Três isoformas distintas de NOS têm sido identificadas como produtos de diferentes genes, apresentando localização, regulação, sensibilidade a inibidores e propriedades catalíticas características: neuronal (nNOS), encontrada primeiramente no tecido neural, mas também presente em muitos tipos celulares; endotelial (eNOS), originalmente descrita no endotélio; e induzível (iNOS), predominantemente encontrada em condições inflamatórias (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Alguns autores classificam de outra forma: as isoformas da NOS sendo agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas. A c-NOS e a i-NOS diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO. A isoforma constitutiva compreenderia a NOS neuronal (n-NOS, tipo I), presente normalmente nos neurônios, e a NOS endotelial (e-NOS, tipo III), presente normalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Os efeitos fisiológicos do $\cdot\text{NO}$ são determinados pela atividade da cNOS, enquanto os citotóxicos estão geralmente associados com a expressão de iNOS (LIAUDET; SORIANO; SZABÓ, 2000).

Em algumas circunstâncias, a NOS catalisa a síntese do ânion superóxido (PORASUPHATANA; TSAI; ROSEN, 2003). Estudos *in vitro* demonstram que a nNOS possui maior propensão a produzir superóxido sob concentrações sub-saturadas de L-arginina ou BH_4 (POU et al., 2010), ou na presença de alguns inibidores de NOS, como o NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) (KLATT et al., 1993), enquanto que a cNOS parece sintetizar quantidades detectáveis, porém baixíssimas de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (~500 nmol / minuto / mg) (LIST et al., 1997). Todas as isoformas de NOS são capazes de gerar $\text{O}_2^{\cdot-}$, o que não se sabe ainda é se este fenômeno acontece fisiologicamente (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Em virtude da rápida reação entre $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$, a síntese de ambas as espécies pela mesma enzima possibilita a formação de peroxinitrito (ONOO^-), ou a liberação de ambas as espécies. O ONOO^- é considerado uma das espécies reativas de nitrogênio (ERNs) altamente lipoperoxidante envolvida em diversas condições patológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O $\cdot\text{NO}$ se liga rapidamente a alguns metais de transição, tal como o íon ferro na guanil ciclase, ativando esta enzima e resultando na formação de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). Esta ligação do $\cdot\text{NO}$ com o ferro, não

somente se constitui no seu maior mecanismo de ação, mas também parece desempenhar um papel maior na sua inativação e remoção através da sua ligação ao ferro da hemoglobina.



A reação do superóxido com o $\cdot\text{NO}$ para produzir peroxinitrito ocorre aproximadamente três vezes mais rápido do que a dismutação do superóxido para produzir peróxido de hidrogênio, e até mesmo mais rápido do que a reação do $\cdot\text{NO}$ com proteínas heme. Portanto, esta é a reação que acontece quando ambos estão presentes (POWERS; JACKSON, 2008).

O peroxinitrito (ou sua forma protonada ONOOH) é um forte agente oxidante e pode levar à depleção de grupos tiol, lesão de DNA, e nitração de proteínas. Um efeito adicional da formação de ONOO^- é a diminuição da biodisponibilidade de superóxido e $\cdot\text{NO}$. Além do $\cdot\text{NO}$ e do ONOO^- existem outras ERNs menos conhecidas, como o N_2O_3 às quais são conferidas muitas das ações desta família de compostos (POWERS; JACKSON, 2008).

1.2.3 Capacidade Antioxidante

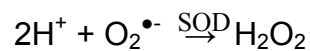
Uma substância é considerada antioxidante quando, em baixas concentrações (comparadas àquelas de um substrato oxidável), diminui significativamente ou inibe a oxidação daquele substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Existem vários mecanismos de defesa naturais constituindo o sistema de defesa antioxidante. Este sistema é formado por enzimas e substâncias antioxidantes. Como defesa química, as vitaminas E, C e o ácido úrico são exemplos. O plasma humano e de animais apresentam efeitos antioxidantes significativos que, em larga extensão, são exercidos por estes compostos. Proteínas como ceruloplasmina, transferrina e ferritina também podem atuar como antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

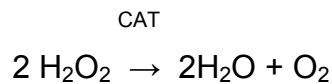
Dentre as enzimas, destacam-se a superóxido dismutase (SOD) (presente em organismos aeróbios), a catalase, e a glutathione peroxidase (GSH-Px). As enzimas antioxidantes constituem o principal mecanismo de defesa antioxidante

intracelular, prevenindo as reações em cadeia desencadeadas por estas espécies químicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Abaixo encontramos a descrição dos principais sistemas antioxidantes:

- superóxido dismutase (SOD): A primeira defesa contra o radical superóxido é a enzima superóxido dismutase (SOD). Nos mamíferos, existem duas isoenzimas de SOD: a Cu-Zn-SOD (citosólica) e a Mn-SOD (mitocondrial). Catalisa a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 na presença de próton H^+ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

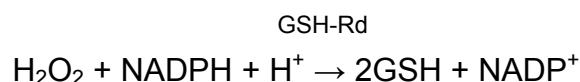


- Catalase: É uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a reação



A catalase (CAT) é encontrada em todos os órgãos, principalmente nos hepatócitos e eritrócitos, e está também presente em grandes concentrações nos peroxissomas e em baixas concentrações nas mitocôndrias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

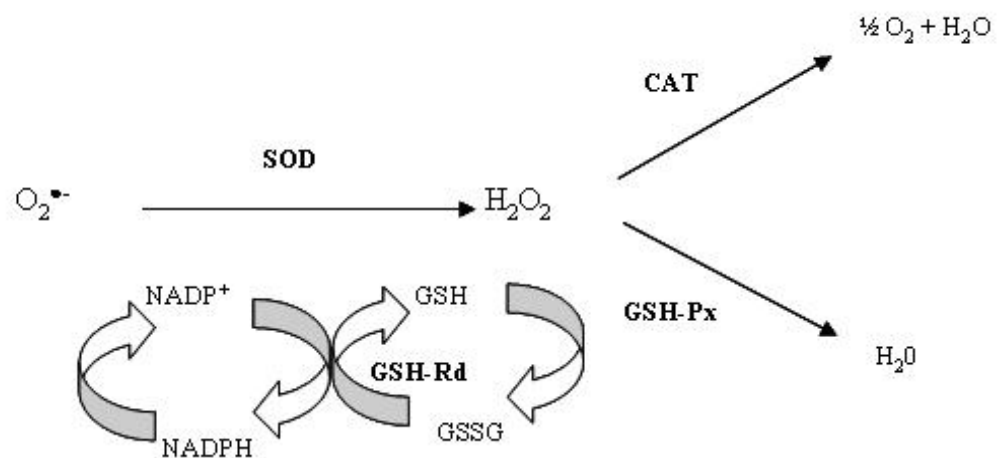
- Sistema glutaciona peroxidase/glutaciona redutase (GSH-Px/GSH-Rd): a glutaciona peroxidase (GSH-Px), responsável pela detoxificação do H_2O_2 , possui menos especificidade para o substrato, sendo capaz também de reduzir hidroperóxidos orgânicos a álcool. Nas duas reações catalizadas pela GSH-Px, a glutaciona reduzida (GSH) funciona como agente redutor, ou seja, doador de elétrons:



A GSH-Rd é uma proteína dependente de NADPH e, portanto, também depende da integridade da via das pentoses. Sob condições de diminuição de fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo na função de GSH-Rd (MATSUBARA; MACHADO, 1991).

- Antioxidantes não-enzimáticos (ANE): existem numerosos antioxidantes não-enzimáticos em diversos tipos celulares, cujas ações foram bem descritas em diversas revisões de literatura (JI, 1999; DICKINSON; FORMAN, 2002; GLANTZOUNIS et al., 2005). Entre os ANE mais conhecidos encontram-se a GSH, a bilirrubina, o ácido úrico, e as vitaminas, destacando-se as A, C e E.

Figura 5 - Representação esquemática do sistema antioxidante enzimático.



1.2.4 Mecanismos de Lesão a Alvos Celulares Por Estresse Oxidativo: Lipoperoxidação e Dano Protéico.

Uma vez que os radicais livres podem iniciar uma cadeia de reações em algumas moléculas biológicas, um número de outras espécies radicalares é formado como parte deste processo. Um exemplo destas espécies radicalares secundárias inclui os radicais formados durante a peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica é definida como “a deterioração de lipídios poliinsaturados”. Ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que contêm duas ou mais ligações duplas entre carbonos. Ácidos graxos monoinsaturados ou saturados também podem ser oxidados, sendo este um evento mais difícil de ocorrer (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

As membranas celulares e de organelas contêm grandes quantidades de cadeias laterais de ácido graxos poliinsaturados (Quadro 1). São, portanto, juntamente com proteínas de membrana, alvos constantes do ataque de radicais livres às membranas.

A bicamada lipídica é a estrutura básica de todas as membranas biológicas e é composta de lipídios e proteínas. A peroxidação lipídica de ácidos graxos polinsaturados como o ácido araquidônico ocorre por meio de múltiplos estágios. O radical hidroxil inicia a peroxidação abstraindo um átomo de hidrogênio do carbono do grupo metileno localizado na cadeia lateral. Inicialmente, esta abstração forma um radical lipídico centrado no carbono, e água (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). O radical formado possui um elétron desemparelhado que se estabiliza por rearranjo molecular formando um dieno conjugado. Na presença de oxigênio, o dieno forma o radical peroxil (LOO^\bullet , onde L é o ácido graxo polinsaturado), o qual pode por sua vez, reagir com outro ácido graxo, formando um outro radical, promovendo assim uma das características mais marcantes dos radicais que é a reação em cadeia. A geração de um radical lipídico é terminada pela reação de dois radicais ou quando encontra um antioxidante. Pode também ser reduzido a um peróxido cíclico ou endoperóxido e outros produtos da terminação (Figura 6). A peroxidação lipídica pode resultar em degeneração da estrutura da membrana e perda de função das proteínas (GIROTTI, 1985). O desarranjo estrutural da bicamada lipídica altera sua fluidez e rigidez. Isso permite que proteínas incrustadas na membrana sejam mais diretamente atacadas, alterando atividades essenciais das mesmas, como atividade de enzimas intrínsecas e transportadores, e/ou diminuição da relação ATP/ADP (POWERS; JACKSON, 2008).

Quadro 1 - Algumas ocorrências naturais e comuns dos ácidos graxos
^a número de carbonos na cadeia: número de duplas ligações.

Abreviação ^a	Nome comum	Exemplos de ocorrência
16:0	Palmitato	Gorduras e óleos naturais, principalmente óleo de palmeira.
18:0	Ácido esteárico	Gorduras e óleos naturais, principalmente na carne.
18:1	Ácido oleico	Gorduras e óleos naturais, principalmente óleo de oliva.
18:2	Ácido linoleico	Disseminado, mas principalmente em óleos de sementes.
18:3	Ácido α -linoléico	Folhas de plantas, alguns óleos de sementes.
20:4	Ácido araquidônico	Membranas animais
20:5	Ácido eicosapentaenoico	Óleos de peixes

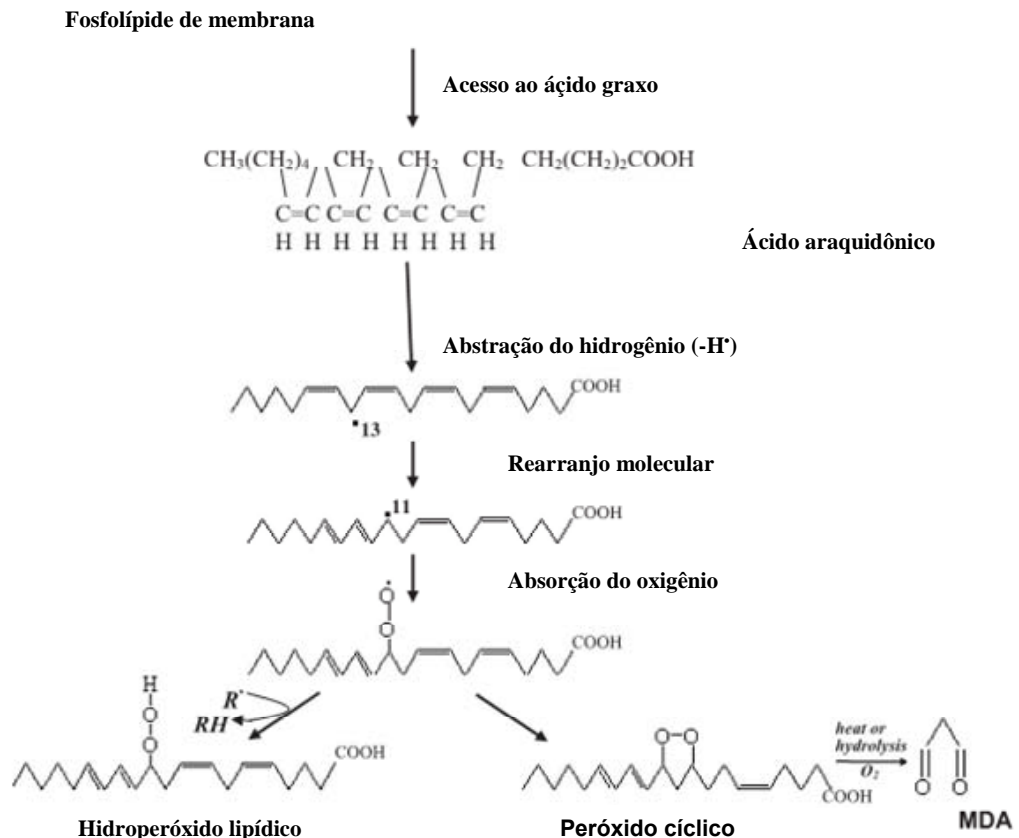
22:6	Ácido docosahexaenóico	Óleos de peixe, cérebro de mamíferos, retina.
------	------------------------	---

Fonte: Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2007.

A liberação de enzimas hidrolíticas e a formação de produtos tóxicos (como o malondialdeído) potencializam o dano celular iniciado por radicais livres (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RHODEN et al., 1998;).

Proteínas também podem ser lesadas pelo ataque direto de radicais livres, ou por meio de ligações entre os produtos finais da cadeia de lipoperoxidação, como o 2,4-hidroxinonenal, ou por glicação/glicoxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Além disso, vários estudos apontam para o estresse oxidativo como modulador de vias proteolíticas dependentes (GOLL et al., 2003; PURINTRAPIBAN; WANG; FORSBERG, 2003; DU et al., 2004) e independentes de cálcio (GOMES et al., 2001; LI et al., 2003).

Figura 6 - Estágios de iniciação e propagação da peroxidação lipídica a partir do ácido araquidônico. MDA – malondialdeído.



Fonte: Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2007.

1.3 ESPÉCIES REATIVAS COMO MODULADORAS DE PROCESSOS BIOLÓGICOS

Muitos estudos indicam que as EROs são importantes mensageiros das vias de sinalização, envolvidas na adaptação celular (ALLEN; TRESINI, 2000). Enquanto altas concentrações de radicais livres podem lesar componentes celulares, níveis baixos a moderados podem desempenhar múltiplas funções regulatórias em vias de sinalização celular, como o controle da expressão gênica, e modulação da função do músculo estriado. A sinalização da expressão por EROs contribui para a adaptação de fibras musculares em resposta tanto ao aumento da atividade contrátil (como no exercício físico), quanto em períodos prolongados de desuso (como na imobilização do músculo estriado esquelético). Este paradoxo na sinalização quanto à função das EROs deve-se provavelmente a diferenças tanto na magnitude, quanto no padrão temporal da produção de radicais livres (POWERS et al., 2010).

O estresse oxidativo provoca modificação no potencial redox da célula que conduz a mudanças nos padrões de regulação da sinalização da expressão gênica. O que se sabe é que a sinalização redox pode influenciar uma série de ativadores transcricionais, levando a alterações na expressão gênica e mudanças no fenótipo da célula. Estas mudanças seriam específicas para cada tipo celular ou grupo de células. De maneira geral, o principal mecanismo pela qual a sinalização redox controlaria a expressão gênica seria através 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). Por exemplo, as EROs são conhecidas por ativar o fator de transcrição nuclear κ -B (NF- κ B) (KANDARIAN; JACKMAN, 2006), e isso parece ser fundamental no entendimento da adaptação celular do músculo estriado, tanto em estados fisiológicos, quanto patológicos.

1.3.1 Regulação de Fosfatases e Quinases por EROs

Uma das mais importantes família de proteínas quinase são aquelas ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*), que são ativadas por EROs e associadas à adaptação celular, principalmente no músculo estriado. Sabe-se que as MAPKs desempenham um papel chave na sinalização celular pela ativação ou desativação de proteínas regulatórias, via fosforilação (CUSCHIERI; MAIER, 2005). Estas quinases estão envolvidas, por exemplo, nas decisões de vida e morte celulares em resposta a vários estímulos dentre os quais se destacam as EROs (MATSUZAWA; ICHIJO, 2005).

Todas as células eucarióticas possuem múltiplas vias MAPK. As três subfamílias que foram mais bem caracterizadas são: (1) quinase c-Jun N-terminal (JNK); (2) p38 MAPK; (3) de sinal extracelular regulado por quinase (ERK, do inglês *extracellular signal-regulated kinase*) (CHEN et al., 2001). Todas as três vias são estruturalmente similares, mas funcionalmente distintas. O mais importante é que evidências demonstram que todas elas são ativadas por estresse oxidativo e podem participar de vias que influenciam a degradação de proteínas ou apoptose (TORRES; FORMAN, 2003; LI et al., 2005). A ativação clássica da cascata das MAPK é constituída de três ativações de proteínas quinases intracelulares seqüenciais, levando à ativação de outras numerosas proteínas quinases, proteínas

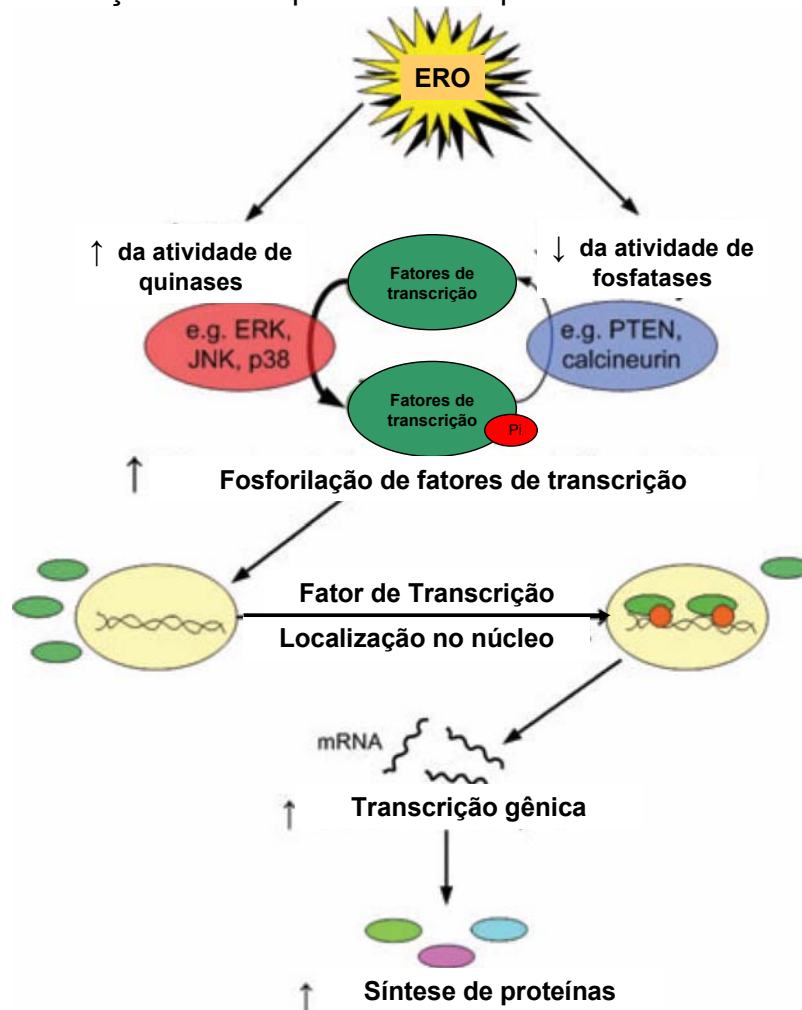
nucleares e fatores de transcrição, resultando em ativação da transdução de sinal (CUSCHIERI; MAIER, 2005) em favor da síntese protéica. Uma breve descrição do envolvimento de EROs com as funções de ERK, p38, e JNK segue abaixo:

- sinais extracelulares regulados por quinases 1 e 2 (ERK 1 e 2): a primeira identificada e melhor estudada cascata de MAPK foi a via ERK (CUSCHIERI; MAIER, 2005; MELOCHE; POUYSSEGUR, 2007). As ERK são constituídas de duas isoformas, ERK1 e ERK2. As ERK 1 e 2 podem ser ativadas por um número de mitógenos, incluindo fator de crescimento epidermal, fator de crescimento derivado de plaquetas e EROs (CUSCHIERI; MAIER, 2005). A ativação de ERK 1 e 2 por estresse oxidativo é consistente com a hipótese de que níveis baixos e adequados de EROs são mitogênicos (QI; ELION, 2005). A ativação de ERK 1 e 2 regula a atividade transcricional do fator ativador de proteínas (AP-1), os oncogenes c-Myc e Bcl-2, envolvidos na sobrevivência mitocondrial (QI; ELION, 2005). Normalmente, a ativação de ERK 1 e 2 promove adaptação celular em favor da sobrevivência (CHEN et al., 2001).

- p38MAPK: importante membro da família MAPK, ativada em resposta a vários estresses fisiológicos, como estresse osmótico, endotoxinas e EROs (CHEN et al., 2001). Uma importante ligação com o estresse oxidativo e a ativação da p38 ocorre via ASK-1 (do inglês *apoptosis-stimulating kinase 1*) (MATSUZAWA; ICHIJO, 2005). ASK-1 (do inglês, *apoptosis signal-regulating kinase 1*) é um membro da família de MAPK capaz de ativar p38 e JNK por fosforilação. Cinco isoformas de p38 foram identificadas: p38 α , p38 β , p38 β 2, p38 γ , e p38 δ , e a expressão delas varia de acordo com o tecido (Quadro 2).

Entre os alvos da fosforilação a partir do p38 estão importantes fatores transcricionais, incluindo p53, e NF- κ B. De particular importância para a apoptose é o fato de que a ativação da proteína supressora tumoral p53 resulta na expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Aumento na expressão de Bax nas células pode promover ativação de caspase-3 via mitocondrial (PRIMEAU; ADHIHETTY; HOOD, 2002). Além disso, a sinalização via p38 pode promover a expressão a favor da proteólise (LI et al., 2005).

Figura 7 - Ilustração da interação das quinases e fosfatases na regulação de fatores de transcrição e subsequente síntese protéica.



Fonte: Adaptado de Powers et al., 2010.

Quadro 2 - Isoformas de p38 e diferentes tecidos onde são expressas.

Isoforma	Ocorrência
P38 α	Medula óssea e leucócitos
P38 β	Coração e cérebro
P38 β 2	Coração e cérebro
P38 γ	Músculo estriado esquelético
P38 δ	Queratinócitos

Fonte: Adaptado de Powers et al., 2010.

- quinase c-Jun N-terminal (JNK): a quinase c-Jun N-terminal (também conhecida como quinase induzida por estresse) também possui três isoformas: JNK1, JNK2, e JNK3, que são codificadas por três diferentes genes.

Todas elas podem ser ativadas em resposta aos mesmos estímulos capazes de ativar p38, incluindo estresse oxidativo (POWERS et al., 2010). Além disso, como a p38, a ativação de JNK via estresse oxidativo acontece via ASK-1 (SHEN; LIU, 2006).

Os alvos moleculares específicos de JNK incluem muitos fatores transcricionais, existindo evidências de que elas possam desempenhar um importante papel na apoptose mediada por estresse oxidativo. Ainda, sendo as EROs incapazes de ativar caspases por si só, a apoptose mediada por EROs requer uma via alternativa de sinalização, que inclui as JNK (MATSUZAWA; ICHIJO, 2005).

Mudanças no estado de fosforilação de moléculas de sinalização desempenham um importante papel no controle da adaptação celular. Neste aspecto, é importante entender que o estado de fosforilação de proteínas regulatórias e/ou ativadores transcricionais é regulado não somente por atividade de quinases, mas também por mudanças na atividade de fosfatases. Em geral, as fosfatases são divididas em duas maiores classes: fosfatases serina/treonina e fosfotirosina, ambas conhecidas por serem redox sensíveis em diferentes tipos celulares (POWERS et al., 2010).

As fosfatases serina/treonina, nomeadas pelos resíduos de aminoácidos de onde os grupos fosfato são removidos, contêm íons de metais sensíveis à oxidação. Inibidores de fosfatases serina/treonina têm demonstrado ativar NF- κ B, outro fator de transcrição redox sensível (SEN; TRABER; PACKER, 1996). De maneira similar às primeiras, a fosfotirosina fosfatase também é suscetível à inativação induzida por oxidação. A sensibilidade se deve por conterem um resíduo de cisteína conservado em seu sítio ativo, sendo que a sua oxidação leva a inativação da enzima (TONKS, 2005). Uma subclasse de fosfatases fosfotirosina, chamada de duplamente específica, pode remover fosfatos de ambos os tipos. Esta subclasse contém duas cisteínas em seus sítios ativos, levando à inativação das enzimas durante condições de oxidação (POWERS et al., 2010). A família de MAPK também é regulada por um grupo de fosfatases duplamente específicas, que inativam MAPKs por meio da clivagem de seus grupos fosfato (CAMPS; NICHOLS; ARKINSTALL, 2000).

1.4 BALANÇO REDOX E SINALIZAÇÃO CELULAR

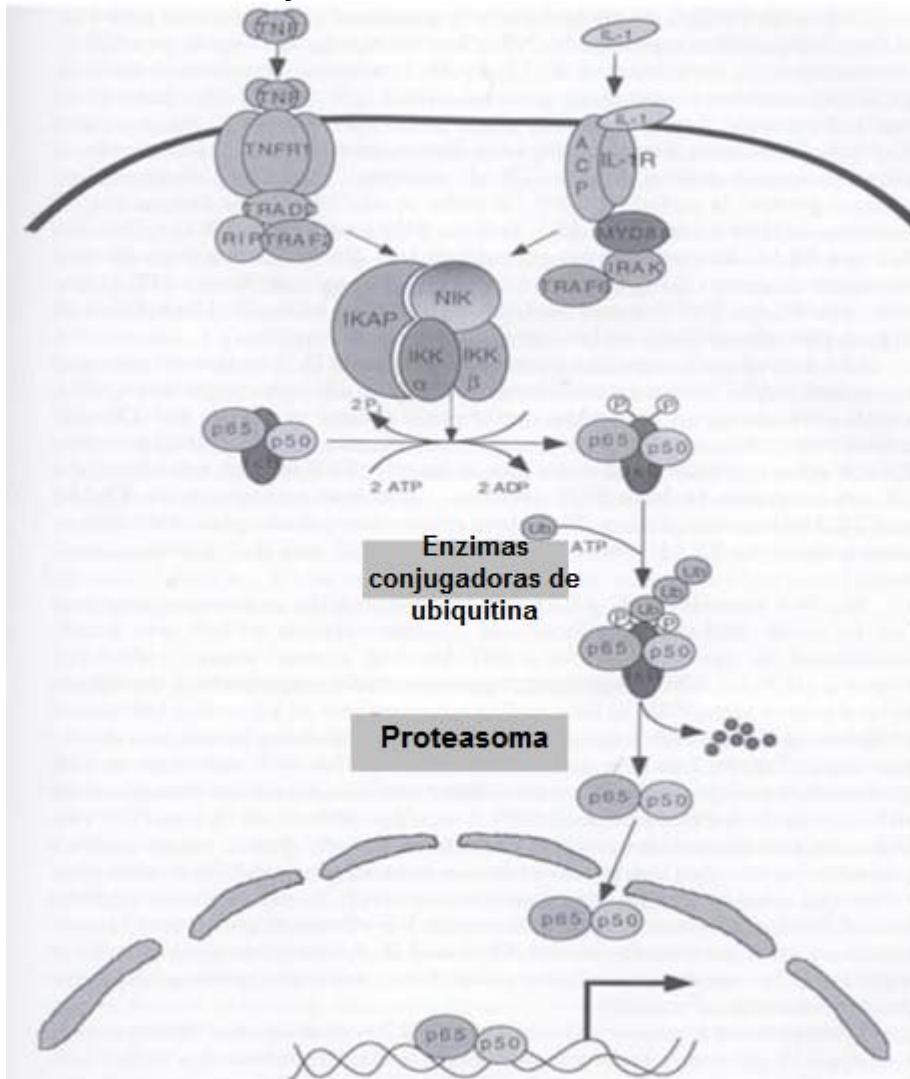
Outra importante ligação entre EROs, sinalização celular e remodelamento, envolve a regulação redox da família de ativadores transcricionais do NF- κ B. Evidências têm indicado que o NF- κ B regula a expressão de mais de 150 genes, e pesquisas recentes tem identificado alvos específicos requeridos para o remodelamento celular, principalmente no que diz respeito ao músculo estriado esquelético (KRAMER; GOODYEAR, 2007).

O Fator Nuclear- κ B (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 facilitar a ligação do NF- κ B ao DNA que, quando ativado, pode promover uma série de resultados, dependendo do tipo celular (JACKMAN; KANDARIAN, 2004). No músculo estriado, todos os cinco membros da família são expressos, mas evidências recentes sugerem que as subunidades p65 e p50 são responsáveis pela maior parte da atividade do NF- κ B no tecido (JACKMAN; KANDARIAN, 2004).

Em células não estressadas, a localização nuclear da seqüência do NF- κ B é ligada à proteína inibitória I κ B no citosol, que previne a dimerização da p65 e p50, e conseqüentemente o seu movimento para o núcleo. No entanto, aumento de EROs no citosol pode ativar a I κ B- α quinase (IKK), resultando na fosforilação da I κ B (Figura 8) (KABE et al., 2005).

Apesar de as EROs poderem promover a ativação no NF- κ B e subseqüente expressão gênica, a atividade de ligação ao DNA do NF- κ B oxidado é diminuída, sugerindo que as EROs também podem inibir a atividade transcricional do NF- κ B (KABE et al., 2005). Portanto, pode-se perceber que o estresse oxidativo pode tanto promover, quanto inibir a ativação transcricional do NF- κ B, o que tem levado a um debate com relação ao seu controle redox e sinalização (PANTANO et al., 2006).

Figura 8 - Representação esquemática da ativação do NF- κ B e sinalização da transcrição celular.



Fonte: Adaptado de Sen, Packer e Baeuerle, 2000.

1.4.1 Regulação da Massa Muscular Esquelética por EROs

Muitos sistemas proteolíticos contribuem para a degradação de proteínas musculares. As proteases mais investigadas no músculo estriado esquelético são as proteases lisossomais, as proteases ativadas pelo Ca^{2+} (ou calpaínas) e o sistema proteasomal (POWERS et al., 2004).

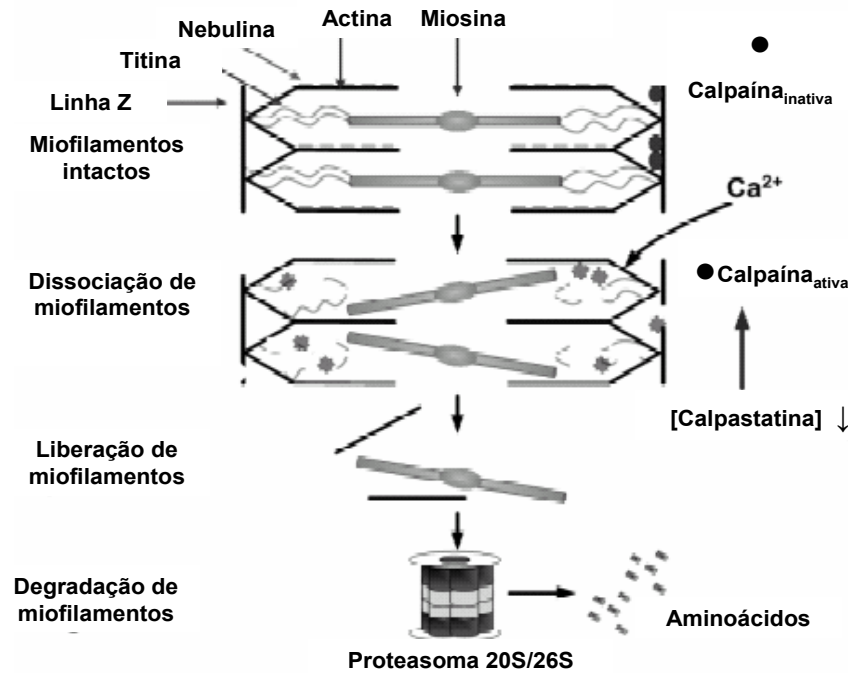
Apesar de as proteases lisossomais serem ativadas no músculo estriado esquelético, levando à atrofia, a importância destas proteases parece limitada (FURUNO; GOLDBERG, 1986). Evidências apontam que tanto as calpaínas, quanto o sistema proteasomal desempenham papel importante na perda protéica durante a atrofia (IKEMOTO et al., 2001). Estudos revelam que outra

protease, a caspase-3, também pode contribuir para formas específicas de atrofia muscular (DU et al., 2004).

As proteínas musculares (50-70%) existem em forma de complexos de actina e miosina. Enquanto o sistema proteasomal pode degradar formas monoméricas de proteínas contráteis (ou seja, actina dissociada da miosina), as proteases lisossomais não degradam complexos intactos de actina-miosina (TIDBALL; SPENCER, 2002). Essa observação sugere que a liberação de miofilamentos seja o limite para ativação da degradação protéica. Alguns trabalhos indicam que tanto as calpaínas quanto a caspase-3 são capazes de produzir dissociação dos complexos de actina-miosina (DU et al., 2004; GOLL et al., 2003). A ativação de uma ou ambas as proteases é necessária para a degradação protéica de miofilamentos durante a perda muscular.

- proteólise mediada por calpaínas: as calpaínas (I e II) são proteases com um grupo cisteína, dependentes de Ca^{2+} , que são ativadas no músculo estriado esquelético durante o desuso ou estados patológicos (GOLL et al., 2003). Apesar de as calpaínas não degradarem diretamente as proteínas contráteis, liberam proteínas sarcoméricas pela clivagem de proteínas do citoesqueleto (como titina e nebulina) responsáveis pela ancoragem dos elementos contráteis (PURINTRAPIBAN; WANG; FORSBERG, 2003). A atividade das calpaínas é regulada por muitos fatores, incluindo cálcio citosólico e concentração de calpastatina, um inibidor endógeno de calpaína (GOLL et al., 2003). Além disso, a atividade da calpaína pode ser aumentada por qualquer fator capaz de elevar concentrações de cálcio citosólico e/ou diminuir níveis de calpastatina. Sabe-se que a inatividade muscular está associada com sobrecarga de cálcio e ativação de calpaína (KOURIE, 1998). Apesar de os mecanismos responsáveis por esta sobrecarga de cálcio ainda serem desconhecidos, é provável que haja envolvimento de EROs no distúrbio iônico das células (KONDO; NISHINO, ITOKAWA, 1994). Uma explicação para esta hipótese é que a formação de aldeídos provenientes da cadeia de lipoperoxidação, como o 2,4-hidroxinonanal e o malondialdeído, reduzem a atividade da Ca^{2+} -ATPase (SIEMS et al., 2003), retardando a remoção do Ca^{2+} do meio intracelular, promovendo seu acúmulo, e conseqüentemente ativando as vias dependentes de cálcio. A ativação do sistema de calpaínas no músculo estriado esquelético encontra-se resumida na Figura 9.

Figura 9 - Ilustração da liberação de miofilamentos mediada por calpaína na atrofia.

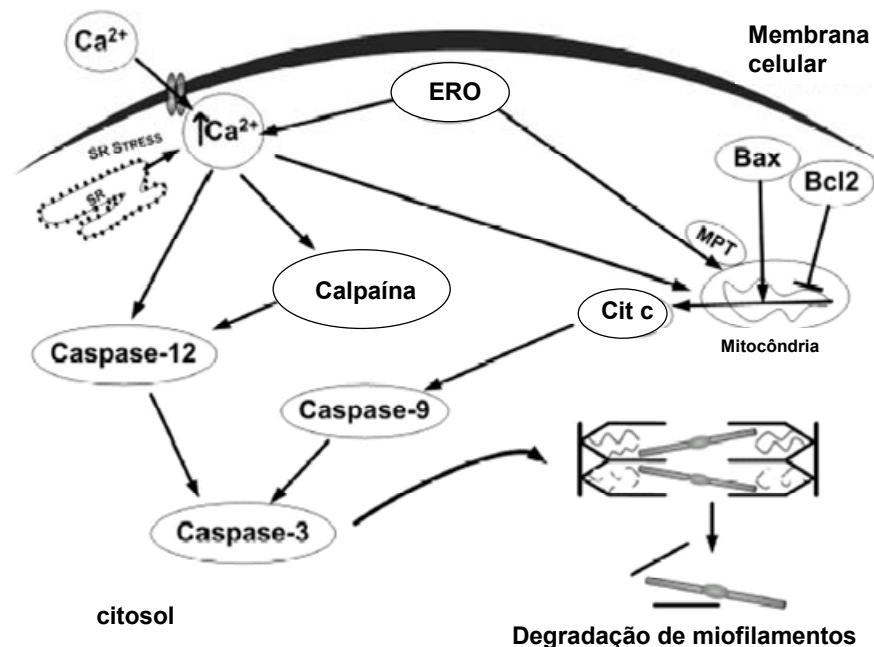


Fonte: Adaptado de Powers et al., 2004.

- caspase-3 e atrofia muscular: numerosas vias de sinalização podem levar à ativação de um único grupo de proteases denominado de “caspases”. Juntas, as caspases são endoproteases que degradam proteínas e, em alguns casos, causam morte celular programada (apoptose). Na célula, as caspases são expressas como precursores inativos chamados de pró-caspases (POWERS et al., 2004). Evidências sugerem que a caspase-3 possa desempenhar um papel importante na perda de massa magra desenvolvida no diabetes, promovendo degradação dos filamentos de actina e miosina (no complexo). A supressão da atividade da caspase-3 suprime a perda de massa desencadeada pelo diabetes (DU et al., 2004). O controle da caspase-3 é complexo e envolve muitas vias de sinalização. No caso do diabetes, é possível que a caspase-3 seja ativada pela ativação da caspase-12 (via liberação de cálcio), e/ou ativação da caspase-9 (via mitocondrial). A chave da interação entre as vias de ativação da caspase-3 é que ambos os caminhos podem ser ativados por EROs (PRIMEAU; ADHIHETTI; HOOD, 2002). A liberação de cálcio ativa caspase-3 por uma via de sinalização que culmina na ativação da caspase-12. A ativação da calpaína também pode contribuir para a

ativação da caspase-3 via liberação de cálcio (Figura 10). A via mitocondrial de ativação da caspase-3 é complexa e pode ser iniciada por numerosas interações incluindo as EROs e um índice pró-apoptótico alto na mitocôndria (LEEUWENBURGH, 2003). As EROs podem levar à liberação do citocromo c, resultando na ativação da caspase-9 e na subsequente ativação da caspase-3.

Figura 10 - Representação esquemática das vias de sinalização que levam à ativação de caspase-3, e que podem ser ativadas por estresse oxidativo, aumentando cálcio intracelular e atividade de calpaína. Existe interação entre as linhas. ROS – espécies reativas de oxigênio; MPT – transição da permeabilidade mitocondrial; Cyt c – citocromo c; SR – retículo sarcoplasmático.



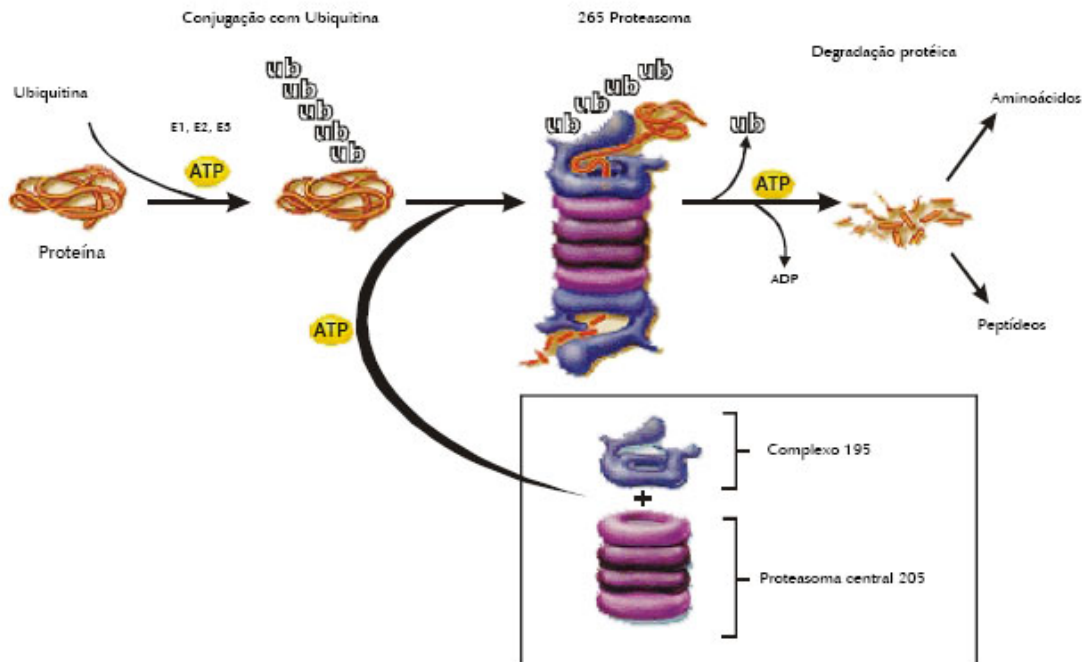
Fonte: Adaptado de Powers et al., 2004.

- proteólise mediada pelo proteasoma: no sistema proteasomal de proteólise, as proteínas podem ser degradadas pelas partes proteasomais 20S e 26S (GRUNE et al., 2003). A porção 26S do proteasoma é composta pela parte central 20S com um complexo regulatório 19S (também chamado de PA700), que possui atividade de ATPase e desempenha um papel importante na degradação ATP-dependente de proteínas ubiquitinadas (Figura 11). No 26S, a ubiquitina se liga covalentemente aos substratos de proteína e os marca para degradação. As proteínas ubiquitinadas são reconhecidas e ligadas pela parte 19S. A energia da hidrólise do ATP remove as cadeias de poliubiquitina, liberando as proteínas que

alimentam a porção 20S, que, por sua vez, pode reconhecer proteínas oxidativamente modificadas sem ubiquitinação (GRUNE; DAVIES, 2003). Parece possível que o estresse oxidativo de maneira isolada possa acelerar a quebra protéica via 20S.

A ligação de ubiquitina a substratos de proteína requer uma enzima ativadora (E1), uma enzima conjugadora (E2), e, em muitos casos, uma enzima ligadora tecido-específica (E3). Duas E3, a atrogina-1 (também chamada de F-box) e ring finger-1 são específicas do músculo, utilizadas em pesquisa como importantes marcadores de perda de massa muscular (GOMES et al., 2001).

Figura 11 - Representação esquemática da via proteolítica ATP-ubiquitina-proteasoma.



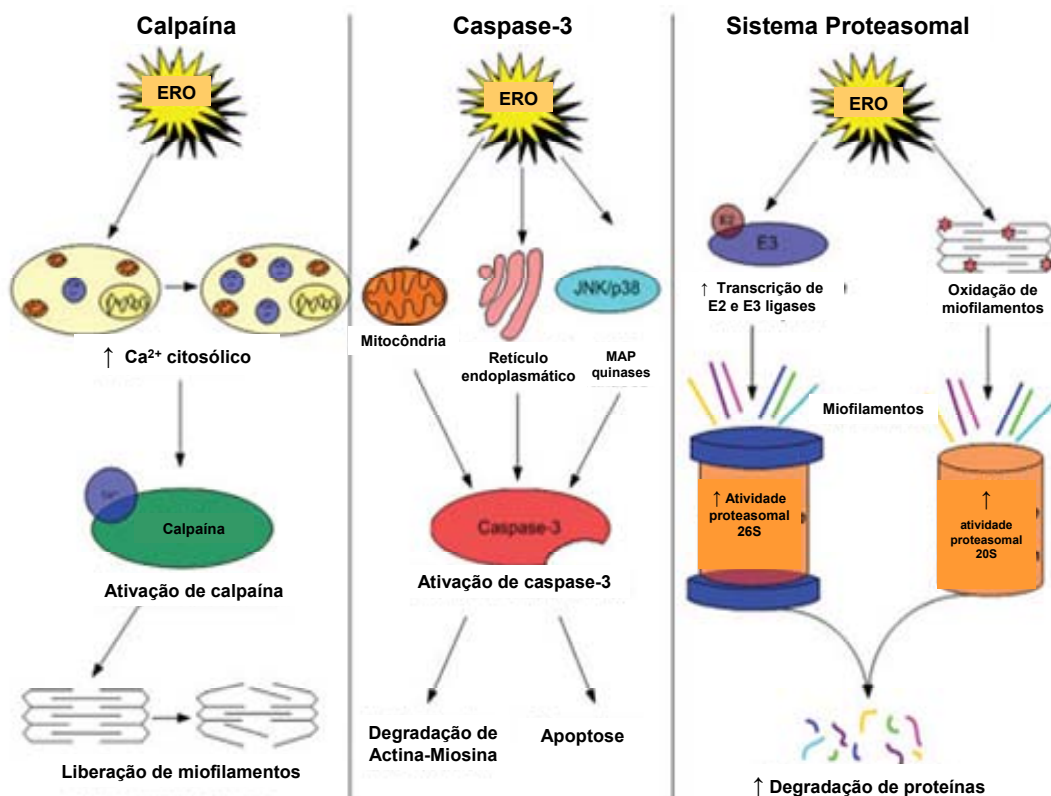
Fonte: Mitch e Goldberg, 1996.

Tem sido demonstrado que as EROs regulam a expressão gênica destes componentes básicos do proteasoma (LI et al., 2003), assim como todas as outras vias proteolíticas.

A primeira evidência de que os oxidantes desempenham um papel na sinalização da atrofia por desuso foi demonstrada por Kondo, Miura e Itokawa (1991). Seus trabalhos mostraram que a imobilização do músculo estriado esquelético está associada com aumento na produção de EROs, resultando em lesão oxidativa nas fibras musculares inativas.

Levando em consideração que calpaínas e caspases são ativadas pelo cálcio, um mecanismo que provavelmente liga estresse oxidativo com sobrecarga de Ca^{2+} é que a formação de aldeídos induzida pelas EROs é capaz de inativar a Ca^{2+} -ATPase, diminuindo a remoção do cálcio da célula, com conseqüente ativação das vias (KOURIE, 1998). Além disso, a via de Caspase-3 também pode ser ativada diretamente por EROs, ou, indiretamente, ser ativada pela saída do citocromo c da mitocôndria, por meio da ação de EROs (POWERS; KAVASIS; McCLUNG, 2007). O envolvimento das principais vias proteolíticas e das espécies reativas de oxigênio encontram-se resumidos na Figura 12.

Figura 12 - Espécies reativas de oxigênio são capazes de ativar várias vias proteolíticas, incluindo calpaínas, caspase-3 e o sistema proteasoma no músculo esquelético. **Fonte:** Adaptado de Powers, et al. (2010).



A atrofia por desuso ou em estados patológicos é um problema clínico importante. Como visto, várias evidências vêm demonstrando, que, em situações fisiológicas e de adaptação ao exercício, as espécies reativas de oxigênio têm atuado como moduladoras de processos de ganho de massa muscular. Várias linhas de evidências ligam EROs e perda de massa, via controle redox da proteólise.

Um crescente número de estudos sugere que antioxidantes ou inibidores de EROs possam servir como agentes terapêuticos na reversão total ou parcial da atrofia, apesar de numerosas perguntas ainda permanecerem sem resposta.

1.4.2 Regulação da Massa Muscular Cardíaca por EROs

Várias são as doenças que promovem hipertensão sistêmica e pulmonar. Dentre elas podem ser citadas diabetes, aterosclerose, arteriosclerose, doenças renais e DPOC. Como dito a respeito da DPOC, também é comum, em todas essas doenças que geram alterações pressóricas, aumento da massa cardíaca e alterações no volume dos ventrículos.

Muitas são as semelhanças no que diz respeito ao controle de ganho ou perda de massa muscular entre o músculo estriado cardíaco e o músculo estriado esquelético. Durante anos, evidências têm sugerido que em muitas doenças ou condições ambientais desfavoráveis, as massas cardíaca e muscular podem estar ao mesmo tempo, aumentadas e reduzidas, respectivamente, uma condição que pode ter conseqüências devastadoras para o estado geral do indivíduo. Por outro lado, algumas formas de atividade física podem produzir, ao mesmo tempo, ganho de massa nos dois tecidos. Claramente, estas duas situações culminam na representação de dois mecanismos envolvidos no balanço das forças que regulam a massa muscular estriada (NADER, 2005).

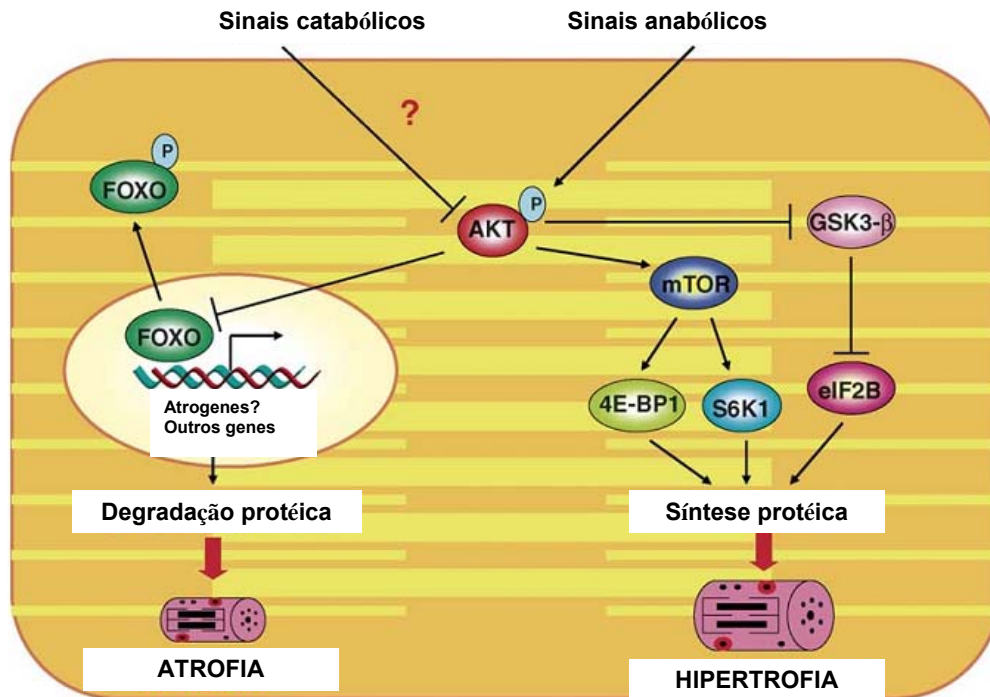
Trabalhos têm demonstrado evidências do papel de uma molécula chamada AKT1 na sinalização, como moduladora, da expressão de dois importantes genes envolvidos na progressão do controle da massa muscular: as já citadas atrogin-1 e MuRF-1, e sua regulação por uma família de fatores de transcrição chamados de *Fork-head box O* (FOXO). Novas evidências demonstram que as expressões de atrogin-1 e MURF-1 são controladas por uma rede de sinalizações que culmina na FOXO e na sua regulação pela AKT1. Estes novos achados são importantes não somente do ponto de vista da atrofia, mas também no aspecto da integração da rede de regulação celular, criando um cenário onde uma molécula chave que está positivamente envolvida no crescimento celular (via síntese protéica) quando no seu estado ativo, também se encontra negativamente envolvida na regulação do processo oposto (degradação protéica) (NADER, 2005). Tal interação sugere que a regulação dinâmica da massa muscular não seja simplesmente um

balanço entre síntese e degradação de proteínas, mas um processo finamente regulado.

Em geral, a hipertrofia muscular é o resultado de um aumento no tamanho das fibras musculares já existentes. Este aumento é refletido pelo aumento na área de secção transversa destas fibras, que por sua vez acontece em consequência do acúmulo de proteínas contráteis na fibra. Como visto o processo contrário, pela diminuição de fibras contráteis, acontece na atrofia (GLASS, 2003). Alguns estudos recentes apontaram uma única série de mecanismos de sinalização associados à hipertrofia muscular. O único alvo é a maquinaria de síntese de proteínas (RENNIE et al., 2004). Os trabalhos iniciais demonstraram que uma única série de exercício de resistência, causando aumento súbito da carga cardíaca, era capaz de induzir aumento na síntese protéica por pelo menos 24 horas após a realização da série (HERNANDEZ et al., 2000). Este aumento na síntese de proteínas foi correlacionado com a ativação da *phosphoinositide-3-kinase* (PI3K), da mTOR (HERNANDEZ et al., 2000), e da AKT (NADER; ESSER, 2001). Em estudos a partir de 2001 descobriu-se que a AKT se encontra no centro da rede de regulação e sua inativação permite a expressão de atrogin-1 e MuRF-1 e, possivelmente, outros atrogenes. Estimulação muscular com outros agentes anabólicos, como IGF-1 levam à ativação da AKT e estímulo da síntese protéica via mTOR por inativar os repressores da síntese de proteínas. Da mesma forma, agentes catabólicos, como glicocorticoides, resultam na inativação de AKT, levando à defosforilação da FOXO, sua translocação nuclear e subsequente regulação dos atrogenes (NADER, 2005). Este complexo mecanismo encontra-se resumido na figura 13.

LI, et al. (2004), mostraram a participação da atrogin-1 no músculo cardíaco, por sua interação com a calcineurina, modulando o processo de hipertrofia cardíaca.

Figura 13 - Mecanismos de sinalização na hipertrofia e na atrofia.



Fonte: Adaptado de Nader, 2005.

O fator mais obscuro nesta rede de sinalização ainda é: quais os fatores que permitem a ativação ou não da AKT1?

Devido à numerosas evidências mostrando a participação de espécies radicalares na ativação e modulação da proteólise, alguns trabalhos apontam para as EROs ou ERNs sendo responsáveis por esta atuação. Pouco tem sido demonstrado neste sentido no que diz respeito ao músculo cardíaco, principalmente na DPOC. Uma evidência neste sentido é o fato de proteínas de choque térmico, conhecidas por sua ação antioxidante, terem sido encontradas onde há hipertrofia cardíaca. Kee e Hardeman (2008) demonstraram, em um modelo experimental, a indução de HSP70 na hipertrofia cardíaca. Shao et al. (2011) mostraram haver carbonilação de proteínas em corações de animais diabéticos com hipertrofia cardíaca.

Estas evidências levam à crença de que as EROs e nitrogênio, assim como no processo de atrofia, participam da sinalização em favor da síntese proteica e conseqüente hipertrofia muscular, tanto no músculo estriado esquelético, quanto no músculo cardíaco.

1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DPOC

Modelos animais de DPOC foram críticos nos últimos anos para o estudo da doença. Gross e colaboradores, em 1965, demonstraram pela primeira vez que a administração intratraqueal, em animais, de papaína resultava em enfisema. Esta descoberta, combinada com achados clínicos de pacientes com deficiência de α -1-antitripsina, formou a base da hipótese elastase-anti-elastase para a patogênese da doença (SHAPIRO, 2000). Hoje, 35 anos depois, esta ainda é a teoria que prevalece para explicar o desenvolvimento do enfisema, e os modelos animais de DPOC ainda permanecem uma ferramenta útil.

Desde os experimentos iniciais, pesquisadores têm instilado uma série de proteinases nos pulmões de pequenos e grandes animais. A administração de elastase pancreática porcina (1-4 mg/kg) tem induzido o mais reproduzível e consistente alargamento dos espaços alveolares em roedores, porcos da Índia, cachorros, e primatas. Resulta em recrutamento agudo de neutrófilos, e acúmulo subagudo de macrófagos nos pulmões. O alargamento dos espaços alveolares continua pelo primeiro mês após a instilação, e então se estabiliza (SHAPIRO, 2000). O modelo de enfisema provocado pela instilação de papaína tem sido usado como uma ferramenta mais econômica, produzindo resultados muito similares (FUSCO et al., 2002).

Assim, a hipótese de trabalho formulada foi a seguinte: Ocorre uma redução dos níveis de antioxidantes e aumento de EROs e da proteólise na atrofia do músculo gastrocnêmio e inversamente, aumento dos níveis de antioxidantes e diminuição de EROs e da proteólise na hipertrofia do músculo cardíaco, em modelo experimental de DPOC. Com o propósito de investigar esta hipótese, o presente estudo foi delineado para verificar o envolvimento de EROs e proteólise no desenvolvimento da perda de massa muscular esquelética, e ganho da massa muscular cardíaca em hamsters com doença pulmonar obstrutiva crônica induzida experimentalmente. Os resultados resultaram na elaboração de dois artigos científicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o envolvimento de EROs no desenvolvimento da perda de massa muscular esquelética, e ganho da massa muscular cardíaca em hamsters com doença pulmonar obstrutiva crônica induzida experimentalmente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, 60 dias após a indução experimental de enfisema em hamster:

- Se o aumento de espécies radicalares na musculatura estriada esquelética possui relação com ativação da proteólise;
- Se o aumento de espécies radicalares na musculatura estriada esquelética possui relação com diminuição da massa muscular;
- Se o aumento ou diminuição de espécies radicalares na musculatura estriada cardíaca possui relação com ativação da proteólise;
- Se o aumento ou diminuição de espécies radicalares na musculatura estriada cardíaca possui relação com a hipertrofia cardíaca e o quadro de *cor pulmonale*;
- Se existe diferença entre o músculo estriado esquelético e o músculo cardíaco no que diz respeito à adaptação celular, nestas condições e se estas diferenças dependem da intensidade da lesão pulmonar.

REFERÊNCIAS

- AASEBO, U.; GYLTNES, A.; BREMNES, R.M.; et al. Reversal of sexual impotence in male patients with chronic obstructive pulmonary disease and hypoxemia with long-term oxygen therapy. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Oxford, v.46, p. 799-803, 1993.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, London, v. 357, n. 3, p. 593-615, Aug. 2001.
- ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biol Med**, New York, v. 28, n. 3, p. 463-499, Feb. 2000.
- AUST, S. D.; ROERIG, D. L.; PEDERSON, T. C. Evidence for superoxide generation by NADPH-cytochrome c-reductase of rat liver microsomes. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 47, n. 5, p. 1133, June. 1972.
- BARBU, C.; IORDACHE, M.; MAN, M.G. Inflammation in COPD: patogenesis, local and systemic effects. **Rom J Morphol Embr**, Bucharest, v.52,n.1, p.21-27, 2011.
- BARNES, P.J. Chronic obstructive pulmonary disease. **N Engl J Med**, Boston, n.4, v.343, p.269-280, 2000.
- BARNES, P.J.; ITO, K.; ADCOCK, I.M. Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase. **Lancet**, London, n.9410, v.363, p.731-733, 2004.
- CASABURI, R. Rationale for anabolic therapy to facilitate rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. **Bailliers Clin Endocr Metab**, New York, v.12, p.407-418, 1998.
- CHIARUGI, P.; CIRRI, P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. **Trends Biochem Sci**, Amsterdam, v. 28, p. 509-514, 2003.
- CUSCHIERI, J.; MAIER. R.V. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). **Crit Care Med**, New York, v.33(12suppl), p.417-419, 2005.
- CUTRUZZOLA, F. Bacterial nitric oxide synthesis. **Biochem Biophys Acta**, amsterdam, v. 1411, p. 2-3, 1999.
- DECRAMER, M.; DE BENEDETTO, F; DEL PONTE, A.; MARIANI, S. Systemic effects of COPOD. Respiratory medicine, lessons from a small thiol. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v.99, p.3-10, 2005.
- DEGENS, H.; VEERKAMP, J.H. Changes in oxidative capacity and fatigue resistance in skeletal muscle. **Int J Biochem**, Oxford, v.26, p. 871-878, 1994.
- DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Glutathione in defense and signaling **An New York Academ Sci**, New York, v. 973, p. 488-504, 2002.

- DU, J.; WANG, X.; MIERELES, C.; BAILEY, J. L.; DEBIGARE, R.; ZHENG, B.; PRICE, S. R.; MITCH, W. E. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. **J Clin Invest**, New York, v. 113, p. 115–123, 2004.
- DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, LM.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Méd Lab**, Rio de Janeiro, v.39, n.4, p.343-350, 2003.
- FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schm Arch Pharm**, Berlim, v. 358, n. 1, p. 113-122, 1998.
- FERNANDES, A. C.; BEZERRA, O.M.P.A. Terapia nutricional na doença pulmonar obstrutiva crônica e suas complicações nutricionais. **J Bras Pneum**, São Paulo, v.32, n.5, 2006.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, A. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Méd Bras**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.
- FISCHER, A. B. Intracellular production of oxygen-derived free radicals. **Proc Acad Nat Sci Phila**, Philadelphia, v. 18, n. 4, p. 118-125, 1987.
- FLU, W.J.; YVETTE R.B.M.; GESTEL, Y.R.B.M.; VAN KUIJK, J.P.V; HOEKS S. E.; KUIPER R.; VERHAGEN H.J.M.;BAX J. J.; SIN D. D.; POLDERMANS D. Co-existence of COPD and left ventricular dysfunction in vascular surgery patients. **Respir Med**, Oxford, v.104, p. 690-696, 2010.
- FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease. **Lab Invest**, Hagerstown, v. 47, p. 412-423, 1982.
- FUSCO, L.B.; PÊGO-FERNANDES, P.M.; XAVIER, A.M.; PAZETTI, R.; RIVERO, D.H.R.F.; CAPELOZZI, V.L.; JATENE, F.B. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. **J Pneumol**, Brasília, v.28, p. 1-7, 2002.
- GIROTTI, A, W. Mechanisms of lipid peroxidation. **Free Rad Res Commun**, New York, v. 1, p. 87–95, 1985.
- GODOY, D. V.; GODOY, R.F.G. Redução nos níveis de ansiedade e depressão de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) participantes de um programa de reabilitação pulmonar. **J Pneumol**, São Paulo, v.28,n.3, p.120-124, 2002.
- GOLL, D. E.; THOMPSON, V. F.; LI, H.; WEI, W.; CONG, J. The calpain system. **Physiol Rev**, Bethesda, v. 83, p. 731–801, 2003.
- GOMES, M. D.; LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; NAVON, A.; GOLDBERG, A. L. Atrogin-1, a muscle specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc Nat Acad Sci U S A**, Washington, v. 98, p. 14440-14445, 2001.
- GOSSELINK, R.; TROOSTERS, T.; DECRAMER, M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v.153, p. 976-980, 1996.

GUPTA, N.K.; AGRAWAL, R.K.; SRIVASTAV, A.B.; VED, M.L. Echocardiographic evaluation of heart in chronic obstructive pulmonary disease patient and its correlation with the severity of disease. **Lung India**, Jaipur, v.28, n.2, p.105-109, 2011.

GUTTRIDGE, D.C.; MAYO, M.W.; MADRIS, L.V.; et al. NG-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. **Science**, Washington, v.289, p.2363-2366, 2000.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch Biochem Biophys**, New York, v. 280, p. 1-8, 1990.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **Am J Clin Nutr**, New York, v. 57, n.5, p. 715S-724S, May. 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical Biol Med**, Oxford: Clarendon Press, p. 22-58, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Mol Aspects Med**, Elmsford NY, v.8, p.89-193, 1985.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free Radical Biol Med**. Oxford: Oxford University Press, 1999.

JESPERSEN, K.; KJAER, M.; SCHJERLING, P. The possible role of myostatin in skeletal muscle atrophy and cachexia. **Scand J Med Sci Sports**. Copenhagen, v.16, p. 74-82, 2006.

KANDARIAN, S. C.; JACKMAN, R. W. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. **Musc & Ner**, Boston, v. 33, p. 155–165, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; V; NELSON, F.; MITCHELL, R.N. O Pulmão in **Robbins Patologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

LI, Y. P.; CHEN, Y.; LI, A. S.; REID, M. B. 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**, Bethesda, v. 285, p. c806–c812, 2003.

LIAUDET, L.; SORIANO, F. G.; SZABÓ, C. Biology of nitric oxide signaling. **Crit Care Med**, New York, v. 28, n. 4, p. 37-52, 2000.

LIST, B. M.; KLÖSCH, B.; VÖLKER, C.; GORREN, A. C. F.; SESSA, W. C.; WERNER, E. R.; KUKOVETZ, W. R.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. **Biochem J**, London, v. 323, n. 1, p. 159-165, 1997.

Macchia, A.; Monte, S.; Romero, M.; D'Ettore, A.; Tognoni, G. The prognostic influence of chronic obstructive pulmonary disease in patients hospitalised for chronic heart failure. **Eur J Heart Fail**, New York, n.9, p. 942-948, 2007.

MACNEE, W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Proc Am Thorac Soc**, New York, n.4, v.2 p.258-266, 2005.

MASON, R. P., KALYANARAMAN, B., TAINER, B. E., ELING, T. E. A carbon-centered free radical intermediate in the prostaglandin synthase oxidation of arachidonic acid: spin trapping and oxygen uptake studies. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 255, n. 11, p. 5019-5022, June. 1980.

MASTERS, C., HOLMES, R. Peroxisomes: new aspects of cell physiology and biochemistry. **Physiol Rev**, Bethesda, v. 57, p. 816, 1977.

MATSUBARA, L. S.; MACHADO, P. E. Age-related changes of glutathione content, glutathione reductase and glutathione peroxidase activity of human erythrocytes. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 5, p. 449-454, 1991.

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**, Rio de Janeiro n.21,v.5, p.1565-1573, 2005.

MILLAR, T. M.; STEVENS, C. R.; BENJAMIN, N.; EISENTHAL, R.; HARRISON, R.; BLAKE, D. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxia conditions. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 427, n. 2, p. 225-228, 1998.

MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Mechanisms of muscle wasting: the role of the ubiquitin proteasome pathway. **N Engl J Méd**, Massachusetts v.335, n.25, p.1897-1905, 1996.

MONTEIRO, R.; JATENE, F.B.; PAZETTI, R.; CORREIA, A.T.; MANOEL, L.A.; BERNARDO, W.M.; RIVERO, H.R.F.; OLIVEIRA, S.A. Evaluation of the cardiac morphological alterations secondary to the pulmonary emphysema: experimental study in rats **Braz J Cardiovasc Surg**, Sao Paulo, v.19,n.4 p.371-347, 2004.

OTA, J.S.; PEREIRA, C.A.C. Cor pulmonale. **Med Rib Preto**, Ribeirão Preto, v.31: p.241-246, 1998.

PAUWELS, R.A.; BUIST, A.S.; CALVERLEY, P.M.A. 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**, New York, v.163, p.1256-1276, 2001.

PORASUPHATANA, S.; TSAI, P.; ROSEN, G. M. The generation of free radicals by nitric oxide synthase. **Comp Biochem Physiol., Part C: Toxicol Pharmacol**, New York, v. 134, n. 3, p. 281-289, Mar. 2003.

POU, S.; POU, W. S.; BREDET, D. S.; SNYDER, S. H.; ROSEN, G. M. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 267, n. 34, p. 24173-24176, 2010.

POWERS, S. K.; DUARTE, J.; KAVASIS, A. N.; TALBERT, E. E. Reactive oxygen species are signaling molecules for skeletal muscle adaptation. **Exp Physiol**, Cambridge, v. 95, n. 12, p. 1-9, Oct. 2010.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev**, New York, v. 88, p. 1243-1276, 2008.

PURINTRAPIBAN, J.; WANG, M. C.; FORSBERG, N. E. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. **Com Biochem Physiol. Part B, Biochem Mol Biol**, Oxford, v. 136, n. 3, p. 393-401, Nov. 2003.

RENNIE, M.J.; EDWARDS, R.H.; EMERY, P.W.; et al. Depressed protein synthesis is the dominant characteristic of muscle wasting and cachexia. **Clin Physiol**, Oxford, v.3, p. 387-398, 1983.

RHODEN, E. L.; MAURI, M.; PETTEFFI, L.; DACANAL, F. Efeitos do alopurinol sobre a lipoperoxidação de membranas celulares renais na síndrome da isquemia e reperfusão: estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 13, n. 2, 1998.

RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R; SCHWARTING, R; STRAYER, D. Sistema Respiratório in **Rubin'Pathology 4**. ed.Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

RUTHERFORD, O.M.; JONES, D.A.; NEWHAM, D.J. Clinical and experimental application of the percutaneous twitch superimposition technique for the study of human muscle activation. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, London, v.49, p.1288-1291, 1986.

RUTTEN, F.H.; CRAMER, M.J.; GROBBEE, D.E.; SACHS, A.P.; KIRKELS, J.H.;

RUTTEN, F.H.; CRAMER, M.J.; GROBBEE, D.E.; SACHS, A.P.; KIRKELS, J.H.; LAMMERS, J.W. Unrecognized heart failure in elderly patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Heart J**, London, v.26, n.18, p.1887-1894, 2005.

SATTA, A.; MIGLIORI, G.B.; SPANEVELLO, A. et al. Fibre types in skeletal muscle of chronic obstructive pulmonary disease patients related to respiratory function and exercise tolerance. **Eur Respir j**, London, v.10, p.2853- 2860, 1997.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Méd Esp**, Niterói, v. 10, n. 4, p. 308-313, July/Aug. 2004.

SCHOLS, A.M.; SOETERS, P.B.; DINGEMANS, A.M.; et al., Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. **Am Rev Respir Dis**, New York, v.147, p. 1151-1155, 1993.

SEN, C. K.; SIES, H.; BAEUERLE, P.A.; Reactive oxygen species as costimulatory signal of cytokine-induced NF-kappa B activation pathways. In: BAEUERLE, P. A.; Antioxidant and redox regulation of genes, **Academic Press**, San Diego, p. 185, 2000.

SHEN, H.M.; LIU, Z.G. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radical Biol Med**, New York, v. 40, p. 928–939, 2006.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med**, New York, v. 9, n. 3c, p. 31-38, 1991.

TORRES, M.; FORMAN, H. J. Redox signaling and the MAP kinase pathways. **BioFact**, Oxford, v. 17, n. 14, p. 287–296, 2003.

VAN VLIET, M.; SPRUIT, M.A.; VERLEDEN, G.; et al. Hypogonadism, quadriceps weakness, and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v.172, p.1105-1111, 2005.

WALSMITH, J.; ROUBENOFF, R. Cachexia in rheumatoid arthritis. **Int J Cardiol**, Amsterdam, v.85, n.1, p. 89-99, 2002

ZHOU, J.; BERNHARD, B. NO and transcriptional regulation: from signaling to death. **Toxicology**, Amsterdam, v. 208, n. 2, p. 223-233, Mar. 2005.

ANEXOS

ANEXO A**ARTIGO 1****Oxidative stress and proteolysis at right and left ventricles hypertrophy on an experimental model of emphysema.**

Jair Tonon¹, Flávia Alessandra Guarnier¹, Cláudia Roberta Brunnquell¹, Sara Santos Bernardes², Alessandra Lourenço Cecchini², Rubens Cecchini^{1*}.

***Corresponding author:**

Rubens Cecchini

Laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livres

Departamento de Patologia Geral

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

Universitário

e-mail: cecchini@uel.br

Phone/Fax +55-43-33714267

86051-990 Londrina, Brasil

ABSTRACT

Although cardiac muscle hypertrophy has been studied on several diseases, the mechanism by which it occurs in emphysematous individuals, mainly in respect to oxidative stress and proteolysis is still unknown. Thus, we evaluated the oxidative stress and proteolysis involvement on right and left ventricles hypertrophy of emphysematous hamsters induced by

¹ Laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livres, Departamento de Patologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, 86051990 Londrina (Brasil)

² Laboratório de Patologia Molecular, Departamento de Patologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, 86051990 Londrina (Brasil)

two different doses of papain (20 mg/mL – E20 – and 40 mg/mL – E40). Thickness of cardiac ventricles, total and cardiac weight, lipid peroxidation, carbonyl proteins, total antioxidant capacity (TAC) and proteasomal proteolytic activity were evaluated on right (RV) and left ventricles (LV) of control and emphysema hamsters. On the RV, thickness was 12% enhanced on E20, while 29% was found on E40. Lipid peroxidation measured by chemiluminescence presented higher levels only on E40 group (from 3350.68 ± 392.44 URL/g tissue to 4696.63 ± 1076.70 URL/g tissue, $p < 0.05$) TAC also increased only on E40. On LV, chemiluminescence values increased from 4044.77 ± 503.39 to 5517.10 ± 388.27 on E20 and 8169.14 ± 1748.77 URL/g tissue on E40 ($p < 0,05$ for both). TAC significantly increased on E20 and E40. No differences were detected on substances reactive to thiobarbituric acid or carbonyl proteins when compared ventricles or doses. Proteasomal proteolytic activity significantly decreased on both groups and ventricles. Emphysema can induce right and left ventricles lipid peroxidation and consequent antioxidant mobilization. In consequence, protection against aldehydes and carbonyl proteins formation and inhibition of proteolysis and hypertrophy.

Keywords: Emphysema. Oxidative stress. Proteolysis. Cardiac muscle.

INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major cause of morbidity and mortality throughout the world. The disease is mainly caused by smoking, but environmental pollution and $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency may also cause its development (Wüst and Degens, 2007). Pulmonary emphysema is considered one of the COPD and patients suffering with disease have constant exercise intolerance. This limitation has primarily been attributed to blood-gas perturbations stemming not only from a decrease in lung function (Mattson and Poole, 1998), but from the typical heart failure presented in this cases (Tan and Wood, 2009).

It is well known that emphysema can have disastrous impact on the heart. On the right ventricle there is often hypertrophy or even failure, which may lead to disease of the left, or the lung disease itself may overcharge the left ventricle (Senior, Lefrak, and Klieger, 1976). Ordinarily, the left ventricle becomes hypertrophic it becomes important since only minimal left ventricular failure can seriously compromise respiratory and, consequently, functions with increased load. In the last decades, several researches have demonstrated skeletal muscle loss and adaptation in animals and patients with emphysema (Farkas and Roussos, 1984; Gosselink et al., 1996; Serres et al., 1998; Mattson and Martin, 2005). Diminished contractile function (Mattson and Martin, 2005), differences in fiber composition and oxidative capacity (Mattson et al., 2002a), activation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway (Ottenheijm et al., 2006), and lipid peroxidation (Mattson et al., 2002b)

are events that have been studied. All of these phenomena have been positively correlated with oxidative species and their influence on the pathways control. Increased Reactive Oxygen Species (ROS) production plays an important role in the regulation of signalling pathways that are required to promote skeletal muscle adaptation in response to both exercise and muscle inactivity (Powers et al, 2010).

Although skeletal muscle hypertrophy and atrophy pathways have been studied on several states such as cancer, AIDS, arthritis, exercise, chronic heart failure and chronic obstructive pulmonary disease, the cardiac muscle hypertrophy and the mechanism by which it occurs in emphysematous individuals, mainly in respect to oxidative stress and proteolysis is still widely unknown. Still, it is not clear if both cardiac and skeletal muscle have the same pathway as far as regulation of mass is concerned, mainly on cardiac compromise in chronic inflammatory diseases. Recently, Usui et al (2011) demonstrated that deletion of Muscle atrophy F-box (MAFbx, Atrogin-1), an E3 ubiquitin ligase, which plays a critical role in mediating skeletal muscle atrophy causes enhancement of cardiac hypertrophy in response to exercise, suggesting that MAFbx negatively regulates physiological hypertrophy in the heart. In this work, authors demonstrated that system downregulation inhibited cardiac hypertrophy through stabilization of nuclear factor- κ B, a very known atrophic pathway regulated by oxygen species on skeletal muscle. Before this, Galasso et al. (2010) suggested that in human heart failure, the protein synthesis pathways decrease signaled by induction of degradation, thereby leading to a molecular state that favours heart muscle loss and left ventricular dysfunction. On the other hand, Kee et al (2008) showed increasing heat shock protein 70, known by its antioxidant potential, on an experimental model of cardiac hypertrophy. Other study demonstrated protein carbonylation on hearts of diabetic rats with cardiac hypertrophy (Shao et al., 2010). No evidence was found in this respect related to COPD and cardiac complications of the disease. Additionally, there is no evidence related to oxidative stress and proteolysis in this disease.

Therefore, we hypothesized that downregulation of proteasomal proteolysis is an important mechanism associated to right and left hypertrophic ventricles of emphysematous hamster hearts and that oxidative stress may mediate this pathway.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult male Syrian Golden hamsters, weighing 130-150g, were used (n=8/group). The animals were given water and commercial food (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrients Ltda., Curitiba, Brazil) *ad libitum*, and the environment was controlled on a 12-h light: 12-h dark cycle. In all respects, the protocols conformed to 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].

The animals were randomly divided into four groups, according to instillation procedure and dose of papain used to induce emphysema. Under deep ketamine/xylazine anesthesia (150/30 mg/kg im), either saline (0.3 mL/100 g body weight) or papain [20 or 40 mg/100 g body weight (Viafarma, Brazil) in 0.3 mL of normal saline] was instilled intratracheally using a 27-gauge hypodermic needle, according to described by Mattson et al. (2002b). To ensure a more uniform papain distribution throughout the lungs each hamster was submitted to a gently manual negative pressure maneuver. The three groups were named: Control + saline (CS): animals instilled only with approximately 0.3 mL of saline; Emphysema 20 mg/mL (E20): animals instilled with approximately 0.3 ml of 20 mg/mL papain on saline; and Emphysema 40 mg/mL (E40): animals instilled with approximately 0.3 mL of 40 mg/mL papain on saline. After the surgery, the animals were returned to their cages and have their appearance and body weight monitored daily for the first two weeks, and once a week thereafter for 60 days.

Tissue preparation

Sixty days after papain injection, hamsters were weighed, euthanized, the heart was weighed and the ventricles were separated. Part of this material was frozen in N₂ liquid and stored at -86°C until the use. The other part of the right and left ventricles, and the middle lobe of the left lung were put on formaline 10% in order to perform morphometric evaluations. In addition, a cachexia index, adapted from Guarnier et al. (2010), was calculated to determine a pattern of general body mass wasting.

For oxidative stress analysis, left and right ventricles from CS, E20 e E40 were prepared as described. Tissues were placed on ice and homogenized for 60-s periods at 60-s intervals in an Ultraturrax homogenizer containing 10 mg/mL or 50 mg/mL of tissue in 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer and 120 mM KCl at pH 7.4. Total homogenate (10 mg/mL) was used for the tert-butyl hydroperoxide-stimulated chemiluminescence and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assays. The supernatant from total homogenate (50 mg/mL) was obtained by centrifugation at 11,000 x g for 15 min at 4°C, and used for the total

antioxidant capacity. For total protein carbonylation, tissues were specially treated according to Reznick and Parker (1994) with adaptations as described later. For proteolytic analysis, during muscle excision, a segment of right and left ventricles of each animal was frozen in liquid N₂, pulverized and frozen at -86°C.

Morphometric analysis

After middle lobe of the right lung, right and left ventricles have been separated, samples were fixed in paraformaldehyde for 48 h and embedded in paraffin for histological studies. Tissues were sectioned into ~7µm thick for heart and ~5µm for lung. Sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E).

In order to verify emphysema establishment and severity, alveolar destruction was determined by the number of times that a predetermined group of coherent lines (1.25mm² of area and 1,50mm of total length) crosses parenchymal structures. The groups identifications were covered and lungs images were captured (5 fields/section, 3 semi-serial sections/animal) on an optical microscope (50x). Images were obtained using a high-resolution camera coupled to the microscope. Then, base of lines was superposed, and, the less times structures are crossed, more extensive is the lesion (Fusco et al., 2002). An image analysis system (Image-Pro-Plus[®] 4.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) was used to determine and count times of intersection.

To evaluate thickness of right and left ventricles, both were cut together on transverse sections. As in lungs, ventricles were fixed in paraformaldehyde, embedded in paraffin and stained with H&E. Two semi-serial sections/ animal were made, identifications were covered and analysis were captured on the same equipments. On each image, five measurements (µm) were performed in order to determine medium thickness of left and right ventricles.

Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

The lipid peroxidation of heart homogenates of all groups was determined by TBARS reaction. Malondialdehyde (MDA) formed during peroxidation reacts in the thiobarbituric acid (TBA) test to generate a colored product, a (TBA)₂ – MDA adduct. In acid solution, (TBA)₂ – MDA absorbs light at 532 nm, and is readily extractable into organic

solvent such as butan-1-ol. MDA levels were measured, and the results were expressed in nmol/g tissue, as described by Oliveira and Cecchini (2000).

Carbonyl protein content

Carbonyl protein content was measured as described by Reznick and Parker (1994), with modifications. About 200 mg of right and left ventricles from all animals were placed in glass homogenization tubes containing 4 mL of homogenizing buffer (50 mM phosphate buffer, 1 mM EDTA, pH 7.4). Tissue samples were homogenized and incubated for 15 min in an ice bath. The samples were centrifuged at 3,000 x g for 10 min at RT, and 1 mL of each protein extract was placed in glass tubes. A volume of 4 mL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) solution prepared in 2.5 N HCl was added to each tube, and the reaction mixtures were incubated for 1 h at RT, with vortexing every 15 min. Next, the samples were washed with 5 mL of 20% TCA (w/v) and centrifuged for 10 min to collect the protein precipitates. Another wash was performed using 10% TCA, and protein pellets were dispersed mechanically. Finally, the pellets were washed 3 times with 4 mL of ethanol-ethyl acetate (1:1, v/v) to remove free DNPH and lipid contaminants. The final precipitates were dissolved in 2 mL of 0.6 M guanidine hydrochloride, and any insoluble materials were removed by additional centrifugation. Carbonyl content was calculated by reading the peak absorbance at 355-390 nm of the DNPH-treated samples, versus samples treated with only 2.5 M HCl. A formula was used to calculate the concentration of carbonyls: $C = \text{Abs (355-390nm)} \times 45.45 \text{ nmol/mL}$, where C is the concentration of DNPH/mL, and 45.45 its absorption coefficient. The procedures were performed in an ice bath until the TCA wash. Carbonyl content was expressed in nmol/mg total protein.

Measurement of tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence

Reaction mixtures were placed in 2-mL luminescence tubes containing the following: total RV or LV heart homogenates (10 mg/mL), 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ buffer (with 120 mM KCl, pH 7.4), and 3 mM tert-butyl hydroperoxide, in a final volume of 1 mL. The tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL) reaction was assessed in a TD/20 20 luminometer (Turner Designs), with a response range of 300-650 nm. The tubes were kept in the dark until the moment of assay, which was carried out in a room at 33°C (Oliveira and Cecchini, 2000; Gonzalez-Flexha et al., 1991). For each animal, an 40-min

curve, where each point represented the differential smoothing of 600 readings, was obtained by interpolation. The results were expressed in relative light units/g tissue (RLU/g tissue). The area under the curve, extracted by integral calculus of each animal curve, was used to determine the lipid hydroperoxides present in the sample.

Total antioxidant reactive potential (TRAP)

This technique measures antioxidant potential due to low molecular mass soluble antioxidants. Homogenates were prepared as described before was measured by CL, in a reaction medium containing 20 μM 2-azo-bis-(2-amidinopropane) and 200 μM luminol. After maximal emission was attained, 70 μL of tissue supernatant or trolox were added to the reaction medium. The time of total quenching was compared with trolox quenching, and the results were expressed in μM trolox (Repetto et al., 1996)

Proteolytic activity

Proteolytic activity was measured by a Proteasome GloTM Chymiotrypsin-like Cell Based Assay kit (Promega, Madison, USA). Briefly, the addition of Proteasome-GloTM Cell-Based Reagent to the sample results on substrate cleavage by sample proteasome and generation of a luminescent signal produced by the reaction with luciferase, which signal was caught on a Glo-RunnerTM microplate reader luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA). This technique measures proteolytic activity on proteasome, dependent or not to ubiquitination.

During heart excision, a segment of right and left ventricles of each animal were frozen in liquid N₂, pulverized and frozen at -86°C. At the moment of assay, 25mg of the powder were added to 1mL of KH₂PO₄ 10mM, pH 7,4 on NaCl 0,9% and gently homogenized. 50 μL from homogenate were pipeted in duplicates on a 96 wells microplates and final reagent mixture was added to the medium. After 5 minutes, under light protection, the plate was read. The results were expressed on Relative Light Units (RLU)/mg tissue.

Protein concentration

Protein was determined by the method of Lowry et al. (1951), modified by Miller (1959). The method used bovine serum albumin (BSA) as standard.

Statistical analysis

The results are shown as means \pm SEM for eight animals. All values were compared by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test. $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Emphysema condition

Representative images of lung injury are presented on figure 1. The evaluation of lung emphysema was supported by decreased number of crossed alveolar intercepts. No lung injury was present on group instilled with saline solution (CS) only (94.36 ± 7.3 crossed intercepts). On the other hand, the groups instilled with 20mg/mL (E20) and 40 mg/mL (E40) of papain had the values significantly decreased (60.52 ± 2.8 and 52.27 ± 4.7 crossed intercepts, respectively, $p < 0.05$) when compared with CS. The comparison between papain instilled groups (E20 vs. E40) also demonstrated significant difference ($p < 0.05$). The final body weight of E20 and E40 groups presented decreased values of 157.5 ± 10.3 g and 137.37 ± 7.2 g, respectively, with $p < 0.05$ only on E40 group when compared to CS group (171.6 ± 15.9 g). Cachexia index, is calculated taking into account not only the loss of total body weight, but what was gained when compared to the control group without any manipulation (C) and the results expressed in percentage. Thus, the cachexia index were $0.96 \pm 0.32\%$ on CS to $6.28 \pm 0.91\%$ and $9.45 \pm 0.76\%$ on E20 and E40, respectively), The thickness of right ventricle of the E20 group was 12% enhanced in E20, and 29% E40, when CS was used on the comparison. On the left ventricle, no difference was detected on both CS and E20 groups, but 15% of increase was identified on E40 group. All these data, as absolute values for total heart weight, are presented on table 1. In the beginning of experiments, a Control group that suffered no intervention (nor saline or papain) was evaluated showing no representative differences when compared with CS group in any parameter (data not shown).

Oxidative stress

Figure 2A represents CL areas under the curves on both right and left ventricles. On the RV, no difference was verified when C (3385.59 ± 527.32) was compared with CS (3350.68 ± 392.33) and when CS was compared with E20 (3965.28 ± 265.73). However, when E40 was compared with CS, increased CL curves were obtained (4696.63 ± 1076.70 , $p < 0.01$). When LV was analyzed, differences were verified on E20 (5517.10 ± 388.27) and E40 (8169.14 ± 1748.77) when compared with CS (4044.77 ± 503.39), and when E20 and E40 were compared each other ($p < 0.001$). Figure 2B reveals the total antioxidant capacity of RV and LV. On RV, only E40 group demonstrated significantly increased values ($3.46 \pm 0.27 \mu\text{M trolox}$) when compared with CS RV ($2.78 \pm 0.17 \mu\text{M trolox}$, $p < 0.05$). As expected, the comparison between E20 and E40 showed 25.3% of increasing for the second. The LV analysis presented significantly increased antioxidant capacity on both E20 and E40 groups (5.37 ± 0.19 and $6.24 \pm 0.52 \mu\text{M trolox}$, respectively), when compared with CS ($2.93 \pm 0.26 \mu\text{M trolox}$). When this two groups were compared each other, as in CL analysis, an enhancement of 16.27% was found for E40. Figure 3 (A and B) shows that neither TBARS, nor carbonylated proteins demonstrated significant differences between groups.

Proteolytic activity

Significant proteolytic activity decrease was detected on RV when both E20 ($925.38 \pm 264.33 \text{ URL/mg tissue}$) and E40 ($482.86 \pm 69.58 \text{ URL/mg tissue}$) groups were compared with CS ($1585.72 \pm 537.10 \text{ URL/mg tissue}$, $p < 0.05$ for both). On the left ventricle, the phenomenon seemed the same. E20 ($1361.81 \pm 223.81 \text{ URL/mg tissue}$) and E40 ($1094.58 \pm 120.70 \text{ URL/mg tissue}$) showed significant decrease when compared with CS ($1959.09 \pm 102.77 \text{ URL/mg tissue}$), and no differences were presented between controls (Figure 4).

DISCUSSION

The role of oxidative stress in the mechanism of cardiac hypertrophy was investigated in emphysema induced hamsters, in two different doses. Cardiac hypertrophy have been associated with obstructive pulmonary diseases for many years. In COPD right hypertrophy is known as a state called *cor pulmonale*. Right cardiac chambers become insufficient and hypertrophic due to pressure overload. In emphysema, this pressure overload is caused mainly by capilar destruction that happens as consequence of alveolar injury (Franchini, 2001). In some cases, left ventricle is also compromised (Louridas et al., 1981).

This fact has demonstrated to be a relationship with severity of chronic obstructive pulmonary disease (Gupta et al., 2011). In our experimental model, we instilled two different doses of papain, leading to two different levels of pulmonary injury. In our study, in order to demonstrate that emphysema was established, impaired crossed alveolar intercepts both in E20 and E40 were detected, and when they were compared each other, E40 demonstrated more severe alveolar destruction than E20. In agreement, both right ventricles had their wall thickness enhanced on both doses, and the left ventricle demonstrated increased thickness only when 40 mg/mL papain were instilled. This data reinforces the fact that the heart suffered adaptation recurrent to the disease, and that RV and LV have different responses to the stimuli. Systemic adaptations also happened, as demonstrated by general body mass loss.

Cardiac and skeletal muscles have a lot in common. Their structure and cellular components have no such differences and their behaviour in what is related to trophic aspects has the same profile. Recent studies of our laboratory (Guarnier et al., 2011) and other recent researches (Mattson, 2002; Powers, 2010) have been demonstrating the involvement of oxidative stress on skeletal muscle loss. It seems that ROS have been proposed to contribute to skeletal muscle dysfunction in a variety of ways. For example, Brotto and Nosek (1996) demonstrated a blunted Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum and Andrade et al (1998) demonstrated reduce Ca^{2+} sensitivity in skeletal muscle exposed to H_2O_2 . ROS have been implicated in enzymatic dysfunction within the glycolytic pathway, the citric acid cycle, and the electron transport system, suggesting that elevated ROS may impair cellular energetics within skeletal muscle (Andersson et al., 1998; Corretti et al., 1991). Additionally, nitric oxide has been demonstrated to depress myosin ATPase activity in skeletal muscle. Besides, a previous study demonstrated that the treatment of C_2C_{12} myotube cells with $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ causes a significant rise in MDA levels with concomitant increase in the catabolism of myofibrillary protein and expression of the major components of the ubiquitin-proteasome pathway (Gomes-Marcondes and Tisdale, 2002). The authors of that study suggested that mild oxidative stress increases protein degradation in skeletal muscle by causing upregulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in this “in vitro” model. The role of reactive oxygen and nitrogen species in this context remains obscure. In the present study, we employed a very sensitive CL method (Zimiani et al., 2005; Oliveira and Cecchini, 2000; Barbosa et al., 2003) which estimates both membrane lipid hydroperoxide formation and antioxidant depletion (Zamburlini et al., 1995; Llesuy et al., 1990). This assay indicates that the increase in CL is closely related to the oxidative stress previously demonstrated by the tissue. It induces the consumption of antioxidants and augments the

formation of lipid hydroperoxides, which results in increased photon emission (Oliveira and Cecchini, 2000; Barbosa et al., 2003). Area under the CL curves showed increased values on RV of animals instilled with 40 mg/mL of papain. This fact was coincident to antioxidant capacity analysis, that presented significant increasing only on E40. The LV presented enhanced CL curves on 20 and 40 mg/mL instilled doses. In this analysis, as in CL, TRAP showed increased values on both E20 and E40 groups. In respect to the increased values, and not impaired, as expected, Palace et al. (1999) demonstrated that the supply of vitamin A to the myocardium by storage organs during increased oxidative stress subsequent to myocardial infarction (MI) was showed in hemodynamically assessed rats using compartment analysis of a radio-labeled vitamin A. It seems there is a transport of antioxidants stimulated by free radicals presence, inhibiting the progression of lipid peroxidation chain. It also seems the case demonstrated in our analysis.

Mild oxidative stress has been shown to induce protein oxidation with increased intracellular proteolysis (Grune et al, 1995; Davies, 2001; Grune et al., 2003). Additionally, it has been postulated that mammalian cells are able to selectively remove moderately aldehyde-modified proteins from their intracellular protein pools and that the proteasomal system is responsible for this activity (Grune and Davies, 2003). The bulk of oxidized protein can be degraded by the proteasomal system (Gomes-Marcondes and Tisdale, 2002; Mastrocola et al., 2008; Shang, Gong and Taylor, 1997), particularly those modified by aldehydes and peroxides (Grune et al., 1995; Grune and Davies, 2003). In line with this, we can hypothesize that enhanced antioxidant capacities in RV and LV in both doses were able to prevent formation of end products of lipid peroxidation since no differences on MDA or carbonyl protein levels were demonstrated. Thus, antioxidant capacity was crucial on lipid peroxidation and protein protection. The importance of these findings is reinforced when considering the high reactivity of malondialdehyde and 4-HNE with proteins (Grune and Davies, 2003). Moreover, malondialdehyde was the most reactive bifunctional aldehyde among several others tested, and it also showed 10-fold more reactivity than H₂O₂ (Yuan, Zhu and Sayre, 2007).

Besides, Usui et al (2011) demonstrated that downregulation of atrogin-1 influences cardiac trophic in part through stabilization of I κ B- α and inactivation of nuclear factor- κ B, important factors on proteolysis signaling. Taken together, inhibition of atrogin could attenuate pathological hypertrophy, thereby protecting the heart from progression into heart failure. The importance of these findings is that atrogin was discovered as a molecule skeletal muscle specific (Gomes et al., 2001) and now, apparently, cardiac regulation of

muscle mass has the same mechanism present on skeletal muscle: proteolysis signaling through a kinase cascade (Powers, 2010). Our results of proteolytic activity clearly demonstrates the effect of oxidative imbalance on proteolysis inhibition. In our study, the assay employed is able to measure total proteolysis related to proteasome, and not only that one connected to ubiquitin-marked proteins. It seems important since oxidized proteins can be degraded by 20S proteasome without ubiquitination (Davies, 2001). We found impaired proteasomal proteolytic activity both E20 and E40 groups, in RV and LV.

Structure and function of contractile proteins on skeletal and cardiac muscles are practically the same. Guarnier et al (2010) demonstrated in skeletal muscle of rats with cachexia induced by cancer that oxidative stress is related with proteolysis and when rats were treated with an antioxidant, there were reversion on CL, TBARS, carbonyl proteins, and also proteolysis. It seems reasonable to suppose that, when hypertrophy happens on cardiac muscle, there is, at the same manner, involvement of reactive species.

In summary, despite the increasing in the heart weight, the thickness of left and right ventricles at E20 and E40 and no change in TBARS or protein carbonylation, there is an antioxidant mobilization of antioxidants towards the heart in order to preserve its function, also preserving structural proteins. This was evidenced by the decrease in proteasomal proteolytic activity. Moreover, the increase of oxidative stress evidenced by CL signs towards to the long term cardiac dysfunction on emphysema.

ACKNOWLEDGEMENTS

Grant support was provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Fundação Araucária and FAEP/UEL. We are very grateful to J. A. Vargas and Pedro R. S. Dionísio of the Departamento de Ciências Patológicas – Universidade Estadual de Londrina, for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Andersson U, Leighton B, Young ME, Blomstrand E, Newsholme EA. Inactivation of aconitase and oxoglutarate dehydrogenase in skeletal muscle in vitro by superoxide anions and/or nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Aug 19;249(2):512-6.
- Andrade FH, Reid MB, Allen DG, Westerblad H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J Physiol*. 1998 Jun 1;509 (Pt 2):565-75.
- Barbosa DS, Cecchini R, El Kadri MZ, Rodriguez MA, Burini RC, Dichi I, Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids. *Nutrition* 2003; 19(4): 1-83.
- Brotto MA, Nosek TM. Hydrogen peroxide disrupts Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol*. 1996 Aug;81(2):731-7.
- Corretti MC, Koretsune Y, Kusuoka H, Chacko VP, Zweier JL, Marban E. Glycolytic inhibition and calcium overload as consequences of exogenously generated free radicals in rabbit hearts. *J Clin Invest*. 1991 Sep;88(3):1014-25.
- Davies KA. Degradation of oxidized proteins by 20S proteasome. *Biochimie* 2001; 83: 301-310.
- Farkas GA, Roussos C. Histochemical and biochemical correlates of ventilatory muscle fatigue in emphysematous hamsters. *J Clin Invest*. 1984 Oct;74(4):1214-20.
- Franchini KG. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. *Rev Bras Hipertens*. 2001. 8: 125-42.
- Fusco LB, Pêgo-Fernandes PM, Xavier AM, Pazetti R, Rivero DHRF, Capelozzi VL, Jatene FB. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. *J Pneumol*. 2002. 28(1).
- Galasso G, De Rosa R, Piscione F, Iaccarino G, Vosa C, Sorriento D, Piccolo R, Rapacciuolo A, Walsh K, Chiariello M. Myocardial expression of FOXO3a-Atrogin-1 pathway in human heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2010 Dec;12(12):1290-6.
- Gomes MD, Lecker SH, Jagoe T, Navon A, Goldberg A L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Nat Acad Sci* 2001; 98(25): 14440-14445.
- Gomes-Marcondes MCC, Tisdale, MJ. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett* 2002; 180: 69-74.
- Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad Biol Med* 1991;

10: 93-100.

Gosselink R, Troosters T, Decramer M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Mar;153(3):976-80.

Grune T, Davies KJ. The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol Aspects Med* 2003; 24(4-5): 195-204.

Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJA. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; 305: 709-718.

Grune T, Reinheckel T, Joshi M, Davies KJA. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. *J Biol Chem* 1995; 270(5): 2344-2351

Guarnier FA, Cecchini AL, Suzukawa AA, Maragno ALGC, Simão ANC, Gomes MD, Cecchini R. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor. *Muscle Nerve*. 2010 Dec;42(6):950-8.

Gupta NK, Agrawal RK, Srivastav AB, Ved ML. Echocardiographic evaluation of heart in chronic obstructive pulmonary disease patient and its co-relation with the severity of disease. *Lung India*. 2011 Apr;28(2):105-9.

Kee HJ, Eom GH, Joung H, Shin S, Kim JR, Cho YK, Choe N, Sim BW, Jo D, Jeong MH, Kim KK, Seo JS, Kook H. Activation of histone deacetylase 2 by inducible heat shock protein 70 in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2008 Nov 21;103(11):1259-69.

Li JJ, Zhang TP, Meng Y, Du J, Li HH. Stability of F-box protein atrogin-1 is regulated by p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cardiac H9c2 cells. *Cell Physiol Biochem*. 2011;27(5):463-70.

Llesuy SF, Meilei J, Gonzalez-Flecha BS, Boveris A. Myocardial damage inducing by doxorubicin: hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology. *Free Rad Biol Med* 1990; 8: 25-64.

Louridas G, Patakas D, Stavropoulos C. Left ventricular function in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Cardiology*. 1981;67(2):73-80.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

Mastrocola R, Reffo P, Penna F, Tomasinelli CE, Boccuzzi G, Baccino FM, Aragno M, Costelli P. Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 2008; 44: 584-593.

Mattson JP, Miller TA, Poole DC, Delp MD. Fiber composition and oxidative capacity of hamster skeletal muscle. *J Histochem Cytochem*. 2002 a; 50(12):1685-92.

Mattson JP, Sun J, Murray DM, Poole DC. Lipid peroxidation in the skeletal muscle of hamsters with emphysema. *Pathophysiology*. 2002b; 8(3):215-221.

Mattson JP, Martin JC. Emphysema-induced reductions in locomotory skeletal muscle contractile function. *Exp Physiol*. 2005; 90(4):519-25.

Mattson JP, Poole DC. Pulmonary emphysema decreases hamster skeletal muscle oxidative enzyme capacity. *J Appl Physiol*. 1998; 85(1):210-4.

Miller GL. Protein determination for larger numbers of samples. *Anal Chem* 1959; 31: 964.

Nader GA. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37(10):1985-96.

Oliveira FJA, Cecchini R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. *J Parasitol* 2000; 86(5): 1067-1072.

Ottenheijm CA, Heunks LM, Li YP, Jin B, Minnaard R, van Hees HW, Dekhuijzen PN. Activation of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(9):997-1002.

Powers SK, Duarte J, Kavazis AN, Talbert EE. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol*. 2010 ;95(1):1-9.

Repetto M, Reides C, Carretero MLG, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 1996; 255:107-117.

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*. 1994;233:357-63.

Senior RM, Lefrak SS, Kleiger RE. The left ventricle in emphysema and chronic bronchitis. *Geriatrics*. 1976;31(11):103-6.

Serres I, Hayot M, Préfaut C, Mercier J. Skeletal muscle abnormalities in patients with COPD: contribution to exercise intolerance. *Med Sci Sports Exerc*. 1998 Jul;30(7):1019-27.

Shang F, Gong X, Taylor A. Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272 (37): 23086-23093.

Shao CH, Rozanski GJ, Nagai R, Stockdale FE, Patel KP, Wang M, Singh J, Mayhan WG, Bidasee KR. Carbonylation of myosin heavy chains in rat heart during diabetes. *Biochem Pharmacol*. 2010;15;80(2):205-17.

Tan SL, Wood AM. Chronic obstructive pulmonary disease and comorbidity: a review and consideration of pathophysiology. *Panminerva Med*. 2009;51(2):81-93

Usui S, Maejima Y, Pain J, Hong C, Cho J, Park JY, Zablocki D, Tian B, Glass DJ, Sadoshima J. Endogenous muscle atrophy F-box mediates pressure overload-induced cardiac hypertrophy through regulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res*. 2011 Jul 8;109(2):161-71.

Wüst RC, Degens H. Factors contributing to muscle wasting and dysfunction in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2007;2(3):289-300.

Yuan Q, Zhu X, Sayre LM. Chemical nature of stochastic generation of protein-based carbonyls: metal-catalyzed oxidation versus modification by products of lipid oxidation. *Chem Res Toxicol* 2007; 20: 129-139.

Zamburlini A, Maiorino M, Barbera P, Pastorino AM, Roveri A, Cominacini L, Ursini F. Measurement of lipid hydroperoxides in plasma lipoproteins by high-sensitive "single photon counting" luminometer. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; 1256: 233-240.

Zimiani K, Guarnier FA, Miranda HC, Watanabe MAE, Cecchini R. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence. *Nitr Ox Biol Chem* 2005; 13: 196-203.

Figure 1 - Histological images from lungs of hamsters instilled or not with papain in order to induce emphysema. **(A)** Control + saline (CS): animals instilled only with approximately 0.3 mL of saline; **(B)** Emphysema 20 mg/mL (E20): animals instilled with approximately 0.3 ml of 20 mg/mL papain on saline; and **(C)** Emphysema 40 mg/mL (E40): animals instilled with approximately 0.3 mL of 40 mg/mL papain on saline. Animals were euthanized after 60 days. x50 (HE). Alveolar destruction was determined by the number of times that a predetermined group of coherent lines (1.25mm² of area and 1.50mm of total length) crosses parenchymal structures. The less times structures are crossed, more extense is the lesion.

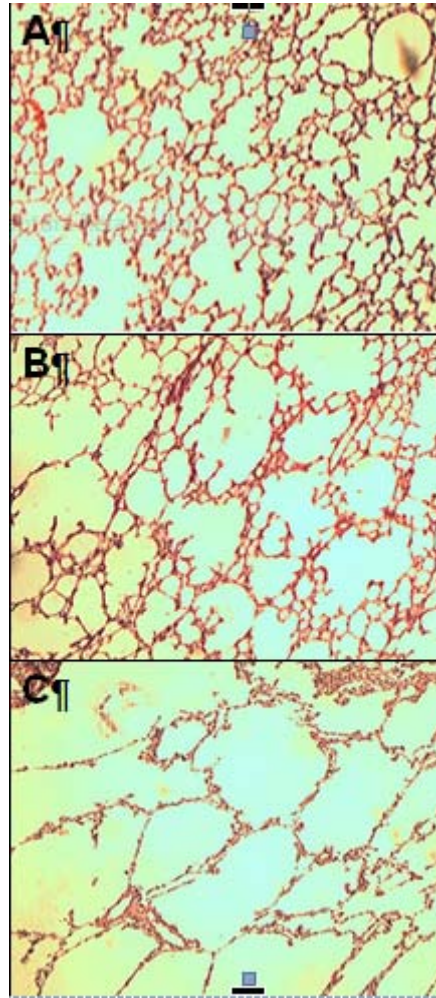


Table 1 - Animal and cardiac adaptation characteristics.

	CS	E20	E40
Crossed Alveolar Intercept	94.36 ± 7.3	60.52±2.8*	52.27 ± 4.7*,†
Total body weight (g)	171.6±15.9	157.5±10.3	137.4±7.2*,†
CI (%)	---	6.28±0.91	9.45±0.76
Heart Weight (mg)	497.7±39.2	501.1±13.2	590.75±38.3*,†
RV (mm)	0.34±0.03	0.36±0.01*	0.39±0.02*
LV (mm)	0.34±0.03	0.38±0.05	0.44±0.02*,†

CS – Group instilled with 300 µL of NaCl 0.9%; E20 – Group instilled with 300 µL of papain 20 mg/mL in NaCl 0.9%; E40 – Group instilled with 300 µL of papain 40 mg/mL in NaCl 0.9%. RV – thickness of right ventricle wall; LF – thickness of left ventricle wall; CI – Cachexia index = (initial body weight – final body weight + body mass gain of CS group) / (initial body weight – body mass gain of CS group) x 100. *p<0.05 when compared with CS and †p<0.05 when compared with E20 by One way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

Figure 2 - Effect of emphysema at right and left ventricles on lipid hydroperoxides and antioxidant capacity in hamsters. **(A)** The *tert*-butyl hydroperoxide initiated chemiluminescence was monitored continuously for 40 min. Area under the curve of each animal curve was determined in order to compare groups. **(B)** Effect of emphysema on total antioxidant capacity (TRAP) in supernatant of right and left cardiac muscles of hamsters treated with two different doses of papain. Results are expressed in μM trolox. Both analyses were performed by One way ANOVA, followed by Bonferroni as post test. $p < 0.05$ was considered significant. RV – right ventricle; LV – left ventricle; CS – Group instilled with 300 μL of NaCl 0.9%; E20 – Group instilled with 300 μL of papain 20 mg/mL in NaCl 0.9%; E40 – Group instilled with 300 μL of papain 40 mg/mL in NaCl 0.9%.

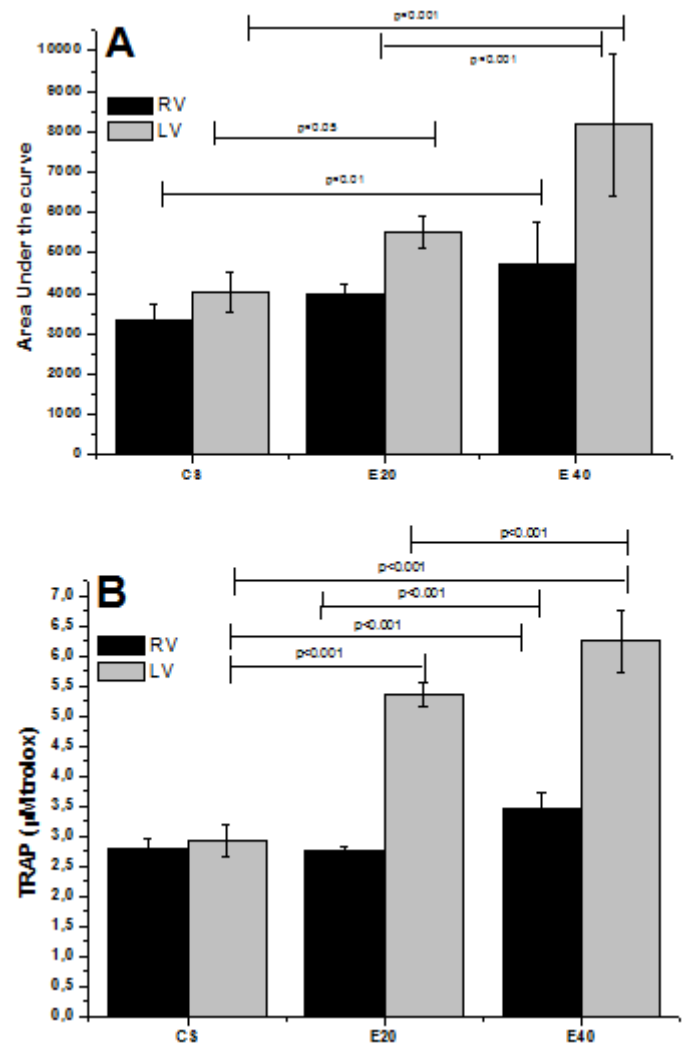


Figure 3 - Effect of emphysema at right and left ventricles on TBARS and carbonyl proteins in hamsters **(A)** TBARS levels in heart ventricles homogenates of hamsters instilled with two different doses of papain. **(B)** Levels of protein carbonylation in RV and LV homogenates of control and emphysema hamsters. Results represent means \pm SD (n=8). For both graphs, RV – right ventricle, LV – Left ventricle. No statistic differences detected by One-way ANOVA followed by Bonferroni multipli comparison test as *post hoc*. CS – Group instilled with 300 μ L of NaCl 0.9%; E20 – Group instilled with 300 μ L of papain 20 mg/mL in NaCl 0.9%; E40 – Group instilled with 300 μ L of papain 40 mg/mL in NaCl 0.9%.

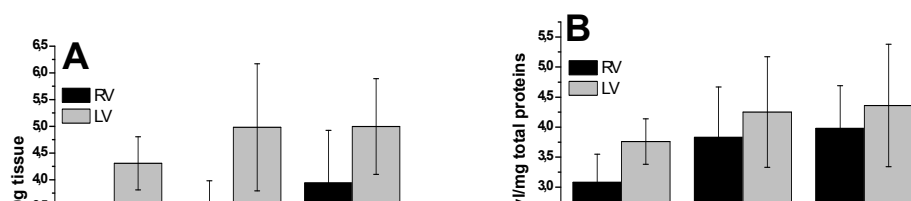
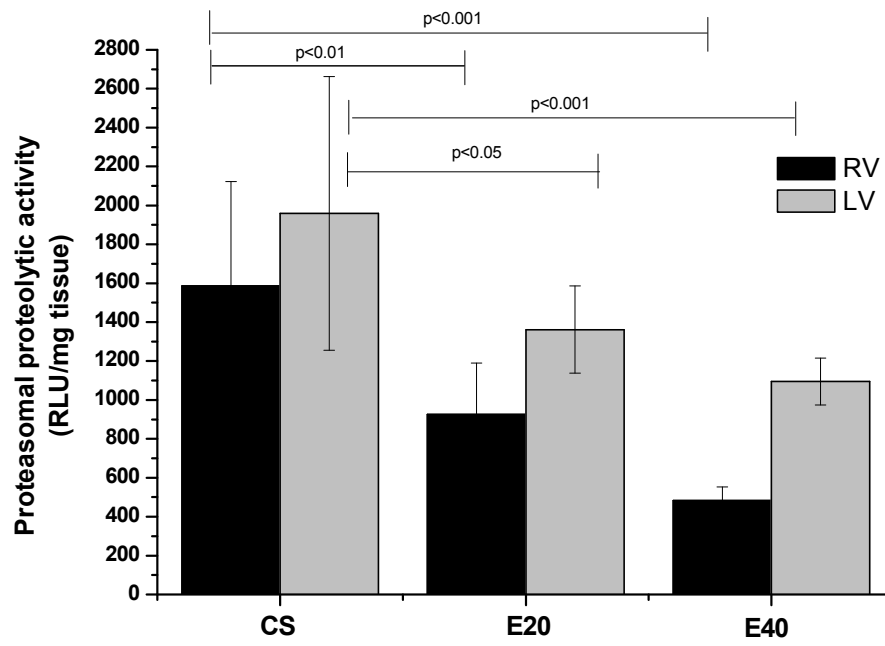


Figure 4 - Proteasomal proteolytic activity based on chymotrypsin-like activity were evaluated on right and left ventricles of hamsters instilled intratracheally, or not, with papain. RV- right ventricle; LV – Left ventricle. Differences statistically significant are pointed on the graph as detected by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple test comparison. CS – Group instilled with 300 μ L of NaCl 0.9%; E20 – Group instilled with 300 μ L of papain 20 mg/mL in NaCl 0.9%; E40 – Group instilled with 300 μ L of papain 40 mg/mL in NaCl 0.9%.



ANEXO B

ARTIGO 2

Lung injury-dependent oxidative status and chymotrypsin-like proteolytic activity of skeletal muscles in hamsters with experimental emphysema.

Jair Tonon¹, Alessandra Lourenço Cecchini², Cláudia Roberta Brunnquell³, Sara Santos Bernardes⁴, Rubens Cecchini⁵, Flávia Alessandra Guarnier^{6*}.

ABSTRACT

Background: Peripheral skeletal muscle is altered in patients suffering from emphysema and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Oxidative stress have been demonstrated to participate on skeletal muscle loss of several states, including disuse atrophy, mechanical ventilation, and chronic diseases. **Methods:** We evaluated body weight, muscle loss, oxidative stress, and proteolysis in the gastrocnemius muscle of emphysemic hamsters. The experimental animals had 2 different severities of lung damage from experimental emphysema induced by 20 mg/mL (E20) and 40 mg/mL (E40) papain. **Results:** The severity of emphysema increased significantly in E20 (60.52 ± 2.8 , $p < 0.05$) and E40 (52.27 ± 4.7 ; crossed the alveolar intercepts) groups. As compared to the control group, there was a reduction on body (171.6 ± 15.9 g) and muscle weight (251.87 ± 24.87 mg) in the E20 group (157.5 ± 10.3 mg and 230.12 ± 23.52 mg, for body and muscle weight, respectively), which was accentuated in the E40 group (137.4 ± 7.2 g and 197.87 ± 10.49 mg, for body and muscle weight, respectively). The cachexia index was high in the E20 ($6.28 \pm 0.91\%$) and E40 ($9.45 \pm 0.76\%$) groups. Additionally, the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL), carbonylated proteins, and chymotrypsin-like proteolytic activity were elevated in the E40 group as compared to the E20 group ($p < 0.05$ for all comparisons). The severity of emphysema correlated well with the loss of body ($r = 0.90$) and muscle ($r = 0.77$) weight, as well as with the progressive increase in CL ($r = -0.97$, $p < 0.05$), TBARS ($r = -0.65$), carbonyl proteins ($r = -0.99$, $p < 0.05$), and total proteolysis ($r = -0.89$, $p < 0.05$). Furthermore, augmentation of proteolysis correlated significantly with CL ($r = 0.97$, $p < 0.05$), TBARS ($r = 0.97$), and carbonyl proteins ($r = 0.78$). **Conclusions:** Taken together, the results of the present study suggest that muscle atrophy observed in this model of emphysema is mediated by increased muscle proteolysis, with possible involvement of oxidative stress in a severity-dependent manner.

¹ Laboratory of Free Radicals and Pathophysiology, Department of General Pathology, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, km 380, Campus Universitário, 86051-990 Londrina, Brazil. e-mail: tonon@uel.br

² Laboratory of Molecular Pathology, Department of General Pathology, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, km 380, Campus Universitário, 86051-990 Londrina, Brazil. e-mail: alcecchini@uel.br

³ Laboratory of Free Radicals and Pathophysiology, Department of General Pathology, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, km 380, Campus Universitário, 86051-990 Londrina, Brazil. e-mail: claudiabrunnquell@hotmail.com

⁴ Laboratory of Molecular Pathology, Department of General Pathology, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, km 380, Campus Universitário, 86051-990 Londrina, Brazil. e-mail: sara.sbernardes@gmail.com

⁵ Laboratory of Free Radicals and Pathophysiology, Department of General Pathology, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, km 380, Campus Universitário, 86051-990 Londrina, Brazil. e-mail: cecchini@uel.br

^{6*} Laboratory of Free Radicals and Pathophysiology, Department of General Pathology, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, km 380, Campus Universitário, 86051-990 Londrina, Brazil. e-mail: faguarnier@uel.br

Keywords: Emphysema. Cachexia. Skeletal muscle loss. Reactive oxygen species. Proteolysis.

BACKGROUND

Emphysema is a form of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), which is associated with high morbidity and mortality worldwide. Emphysema is primarily caused by smoking, although environmental pollution and α 1-antitrypsin deficiency may also lead to its development [1]. Patients typically present altered muscle mass and exercise intolerance [2]. Human studies demonstrated that emphysema is associated with muscle weakness [3], reduced oxidative enzyme activities [4], and elevated exercise-induced muscle phosphocreatine activity [5]. Unfortunately, whether these alterations result from reduced physical activity or from COPD itself is yet to be determined in humans. In addition, data about extension of lung damage and extension of systemic manifestations are scarce. Experimental models of pulmonary emphysema using proteolytic enzymes such as papain or elastase, either instilled or nebulized into the airways of animals, are based on imbalanced protective and aggressive substances in pulmonary tissue. These models result in morphological and histological alterations equivalent to those in humans [6]. The inexpensive, papain-induced emphysema model results in pulmonary and systemic alterations characteristic of emphysema patients. Ventilatory mechanical alterations, increased residual functional capacity, total lung volume, pulmonary complacence [7], cardiac overload [8], and skeletal muscle mass loss [9] are previously reported emphysema-associated alterations.

Mattson and Poole [10] demonstrated that decreased citrate synthase activity in peripheral skeletal muscle of emphysemic hamsters was not associated with the level of animal activity. In addition, the same group of authors [2] reported increased lipid peroxidation, as assessed by malondyaldehyde (MDA) and glutathione levels in the skeletal muscle of hamsters with emphysema. Since the 1990s, investigators have demonstrated that patients suffering from emphysema, chronic bronchitis, and asthma have increased lipid peroxidation, a marker of oxidative stress [11]. Furthermore, previous studies have indicated that elevated levels of reactive oxygen species (ROS) may predispose muscle tissue to fatigue [12] and that ROS are signaling molecules involved in muscle adaptation; furthermore, redox-sensitive kinases, phosphatases, and nuclear factor- κ B have been implicated in muscle loss [13]. Previous studies have described the connection between redox signaling and skeletal muscle adaptation in response to increased muscular activity (i.e., exercise training) [14, 15]

and prolonged periods of muscular inactivity (i.e., immobilization) [16]. Several lines of evidence indicate that ROS signaling is involved in the regulation of the ubiquitin–proteasome system. For example, oxidative stress has been shown to stimulate ubiquitin conjugation to muscle proteins through the transcriptional regulation of the enzymes (i.e., E2 and E3 proteins) that conjugate ubiquitin to muscle proteins to promote proteolysis [17]. In theory, increased expression of the E2 and E3 proteins in skeletal muscles would lead to accelerated proteolysis via the 26S proteasome. Furthermore, evidence indicates that the 20S (core) proteasome can degrade oxidized proteins without ubiquitination [18]. Therefore, it is likely that oxidative stress can accelerate muscle protein breakdown via both the 20S proteasome (alone) and the 26S proteasome complex [13]. The 26S proteasome is a 2.5-MDa multi-protein complex found in both the nucleus and cytosol of eukaryotic cells; it is comprised of a single 20S core particle and 19S regulatory particles at one or both ends. Three major proteolytic activities (described as chymotrypsin-like, trypsin-like, and post-glutamyl peptide hydrolytic or caspase-like activity) occur in the 20S core. Together, these 3 activities are responsible for most of the protein degradation required for maintaining cellular homeostasis, including degradation of damaged cellular proteins. This system is also involved in essential cellular processes such as the response to hypoxemia and muscle tissue regeneration. Existing evidence links the activity of the ubiquitin–proteasome system and the cellular events that occur in the respiratory and peripheral muscles of COPD patients [19]. Thus far, no studies have indicated whether proteasome activity and oxidative stress are correlated with COPD severity.

To determine whether oxidative stress plays an important role in the regulation of skeletal muscle mass in a COPD model and if it is dependent of the severity, we evaluated body weight, muscle loss, oxidative stress, and chymotrypsin-like proteolysis in gastrocnemius muscle tissue in hamsters with 2 different severities of experimental emphysema. This paper reports that emphysema induces increased muscle loss in a way dependent on lung injury extension. In addition, oxidative stress, protein degradation, and chymotrypsin-like proteolytic activity seem to contribute to this mechanism.

METHODS

Animals

Adult male Syrian Golden hamsters, weighing 130–150 g, were used (n = 8/group). The animals were given water and commercial food (Nuvilab CR1; Nuvital Nutrients Ltd., Curitiba, Brazil) *ad libitum*, and the environment was controlled on a 12-h light/dark cycle. The protocols conformed to 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. 5500).

The animals were randomly divided into 3 groups, according to the instillation procedure and dose of papain used to induce emphysema. Under deep ketamine/xylazine anesthesia (150/30 mg/kg im), either saline (0.3 mL/100 g body weight) or papain (20 or 40 mg/100 g body weight [Viafarma, São Paulo, Brazil] in 0.3 mL of normal saline) was instilled intratracheally using a 27-gauge hypodermic needle, according to the procedure described by Mattson et al. [2]. To ensure a uniform papain distribution throughout the lungs, each hamster was submitted to a gentle manual negative pressure maneuver. Briefly, just after papain instillation, in the moment of final expiration, thorax was momentarily restrained in order to avoid lung expansion. After active inspiration, a negative pressure is generated and thorax released. This maneuver, through acute differences of pressure, allows complete spread of papain until distal airways. The 3 groups were labeled as follows: control + saline (CS), animals instilled with only approximately 0.3 mL of saline; emphysema 20 mg/mL (E20), animals instilled with approximately 0.3 mL of 20 mg/mL papain in saline; and emphysema 40 mg/mL (E40), animals instilled with approximately 0.3 mL of 40 mg/mL papain in saline. After surgery, 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 days.

Tissue collection and preparation

Sixty days after papain injection, the hamsters were weighed and euthanized. The gastrocnemius muscle was excised, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -86°C until use. The gastrocnemius muscle has previously been demonstrated as a good indicator of alterations in the skeletal muscle of emphysemic hamsters [20], including those in lipid peroxidation [2]. In hamsters, there is no obvious gross division of fibers in this muscle [21], and therefore, the whole muscle is typically analyzed.

The middle lobe of the left lung was fixed in 10% formalin for morphometric evaluations. For the oxidative stress analysis, muscles from CS, E20, and E40

mice were prepared as described above. Tissues were placed on ice and homogenized for 60-s periods at 60-s intervals in an Ultraturrax homogenizer containing 10 mg/mL or 50 mg/mL of tissue in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ buffer and 120 mM KCl at pH 7.4. The total homogenate (10 mg/mL) was used for the tert-butyl hydroperoxide-stimulated chemiluminescence (CL) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assays. For total protein carbonylation determination, tissues were treated according to the method of Reznick and Packer [22], with adaptations as described below. For proteolysis analysis, during muscle excision, a segment of the gastrocnemius muscle of each animal was frozen in liquid nitrogen, pulverized, and frozen at -86°C . 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 [23].

Morphometric analysis

After the middle lobe of the right lung was removed, samples were fixed in paraformaldehyde for 48 h and embedded in paraffin for histological studies. Paraffin-embedded tissues were sectioned into $\sim 5 \mu\text{m}$ per lung. Sections were stained with hematoxylin and eosin.

To verify emphysema establishment and severity, alveolar destruction was determined by the number of times that a predetermined group of coherent lines (1.25 mm^2 of area and 1.50 mm of total length) crossed the parenchymal structures. The group identifications were covered, and lung images were captured (5 fields/section, 3 semi-serial sections/animal) using an optical microscope ($50\times$ magnification). Images were obtained using a high-resolution camera coupled to the microscope. The base lines were then superposed onto the images; the lesser the structures were crossed, the more extensive was the lesion [6]. An image analysis system (Image-Pro-Plus 4.0; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) was used to determine and count the number of intersections.

Determination of TBARS

The extent of lipid peroxidation of the muscle homogenates from each group was determined by the TBARS reaction. MDA formed during peroxidation reacts in the TBA test to generate a colored product, a $(\text{TBA})_2\text{-MDA}$ adduct. In an acid solution, $(\text{TBA})_2\text{-MDA}$ absorbs light at 532 nm and is readily extractable by an organic solvent such as butanol.

MDA levels were measured, and the results were expressed in nmol/g tissue, as described by Oliveira and Cecchini [24].

Carbonyl protein content

The carbonyl protein content was measured as described by Reznick and Parker [22], with modifications. Approximately 200 mg of gastrocnemius muscle were placed in glass homogenization tubes containing 4 mL of homogenizing buffer (50 mM phosphate buffer, 1 mM Ethylenediamine tetraacetic acid, pH 7.4). Tissue samples were homogenized and incubated for 15 min in an ice bath. The samples were centrifuged at $3,000 \times g$ for 10 min at room temperature (RT), and 1 mL of each protein extract was placed in glass tubes. A volume of 4 mL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) solution prepared in 2.5 N HCl was added to each tube, and the reaction mixtures were incubated for 1 h at RT, with vortexing every 15 min. Next, the samples were washed with 5 mL of 20% trichloroacetic acid (TCA) (w/v) and centrifuged for 10 min to collect the protein precipitates. Another wash was performed using 10% TCA, and protein pellets were dispersed mechanically. Finally, the pellets were washed 3 times with 4 mL of ethanol-ethyl acetate (1:1, v/v) to remove free DNPH and lipid contaminants. The final precipitates were dissolved in 2 mL of 6 M guanidine hydrochloride, and any insoluble materials were removed by additional centrifugation. The carbonyl content was calculated by reading the peak absorbance at 355–390 nm of the DNPH-treated samples, versus samples treated with only 2.5 M HCl. The following formula was used to calculate the concentration of carbonyls: $C = \text{Abs (355–390nm)} \times 45.45 \text{ nmol/mL}$, where C is the concentration of DNPH/mL, and 45.45 is its absorption coefficient. The procedures were performed in an ice bath until the TCA wash step. The carbonyl content was expressed as nmol/mg total protein.

Measurement of tert-butyl hydroperoxide-initiated CL

Reaction mixtures were placed in 2-mL luminescence tubes containing the following: total muscle homogenate (10 mg/mL), 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ buffer (with 120 mM KCl, pH 7.4), and 3 mM tert-butyl hydroperoxide, in a final volume of 1 mL. The tert-butyl hydroperoxide-initiated CL reaction was assessed using a TD 20/20 luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA), with a response range of 300–650 nm. The tubes were kept in the dark until the assay was carried out in a room at 33°C [24, 25]. For each

animal, a 40-min curve, in which each point represented the differential smoothing of 600 readings, was obtained by interpolation. The results were expressed in relative light units/g tissue (RLU/g tissue); after the final calculation, the area, extracted by integral calculus of each animal curve, were used to determine the amount of lipid hydroperoxides present in the sample.

Chymotrypsin-like proteolytic activity

Chymotrypsin-like proteolytic activity was measured using a Proteasome Glo Chymiotrypsin-like Cell Based Assay kit (Promega, Madison, WI, USA). 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. The 3 major proteolytic activities (chymotrypsin-like, trypsin-like, and post-glutamyl peptide hydrolytic or caspase-like activity), occurring within the 20S core of the 26S proteasome complex are responsible for most of the protein degradation, which includes degradation of damaged cellular proteins. Therefore, this coupled-enzyme system, with simultaneous proteasome cleavage of substrate and luciferase consumption of the released aminoluciferin, results in a luminescent signal that is proportional to the amount of proteasome activity in the muscle tissue.

During muscle excision, a segment of the gastrocnemius muscle of each animal was frozen in liquid nitrogen, pulverized, and frozen at -86°C . For the assay, 25 mg of the muscle powder was added to 1 mL of 10mM KH_2PO_4 , pH 7.4, in 0.9% NaCl and gently homogenized. Fifty microliter of the resulting muscle homogenate was pipetted in duplicate onto 96-well microplates, and the final reagent mixture was added to the medium. After 5 minutes, under light protection, the plate was read. The luminescent signal was detected with a Glo-Runner microplate reader luminometer (Turner Designs), and the results were expressed as RLU/mg tissue.

Protein concentration

The protein concentration was determined by the method of Lowry et al. [26], with modifications as described by Miller [27]. This method involved the use of bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Statistical analysis

The results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) for 8 animals. All values were compared using one-way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test, with $p < 0.05$ considered significant. To evaluate the correlation between oxidative variables and emphysema severity and between oxidative variables and chymotrypsin-like proteolytic activity, Pearson's correlation test was used. Values of $p < 0.05$ were considered significant for all analyses.

RESULTS

Emphysema condition

The extent of lung damage in the emphysema groups was evaluated by the number of crossed alveolar intercepts. No lung injury was detected in the saline-treated group (CS) relative to a control group (no saline or papain instillation). Likewise, no difference was observed in any other parameter that was analyzed in CS animals (data not shown). In contrast, the E20 and E40 groups had significantly decreased crossed intercept values (60.52 ± 2.8 and 52.27 ± 4.7 , respectively) as compared to the CS group (94.36 ± 7.3) with $p < 0.05$ for both groups. The comparison between E20 and E40 also demonstrated significant differences in emphysema severity ($p < 0.05$). Representative images of lung injury are presented in Figure 1. Table 1 shows that the final body weight of CS animals (171.6 ± 15.9 g) increased as compared to the E20 and E40 group animals, which presented decreased values (157.5 ± 10.3 g and 137.37 ± 7.2 g, respectively, $p < 0.05$ only for the E40 group). The cachexia index (expressed as a percentage) reflects not only the loss of total body weight but also the absence of weight gain. This index in the E20 and E40 groups reduced by $6.28\% \pm 0.91\%$ and $9.45 \pm 0.76\%$, respectively, as compared to the CS group. The weight of the gastrocnemius muscle was significantly different between the CS (251.87 ± 24.87 mg) and E40 (197.87 ± 10.49 mg) groups, and the E20 (230.12 ± 23.52 mg) and E40 groups, with $p < 0.05$. These results represented an 8.6% muscle loss in the E20 group and a 21.4% muscle loss in the E40 group as compared to the gastrocnemius muscle weight of the CS animals.

Oxidative stress

Figure 2 represents CL areas under the curves extracted from individual 40-min CL curves of each animal. The E20 and E40 groups (3517.24 ± 365.40 URL/g tissue) presented increased curves (4268.36 ± 295.63 and 4835.16 ± 178.12 URL/g tissue, respectively, $p < 0.001$ for both groups) as compared to the CS group. The E20 vs. E40 comparison also presented significant differences in oxidative stress level ($p < 0.05$).

Figure 3A shows TBARS levels in the CS, E20, and E40 groups. Only E40 animals (1.12 ± 0.18 nmol MDA/g tissue) showed significantly increased TBARS relative to the CS group (0.71 ± 0.15 nmol MDA/g tissue, $p < 0.01$). Figure 3B shows the carbonyl protein levels of each group. Similar to the TBARS data, only E40 animals (3.88 ± 0.66 nmol carbonyl/mg total proteins) were significantly different from CS animals (2.67 ± 0.63 nmol carbonyl/mg total proteins, $p < 0.05$) in terms of carbonyl protein level. No differences were detected between the E20 and E40 groups.

Chymotrypsin-like proteolytic activity

A significant increase (113.46%) in the chymotrypsin-like proteolytic activity was detected in the E40 group (2013.06 ± 394.50 URL/mg tissue) compared with the CS group (943.53 ± 262.52 URL/mg tissue, $p < 0.001$); a significant increase (50.84%) of chymotrypsin-like proteolytic activity was also observed in the E40 group as compared to the E20 group (1334.49 ± 285.77 URL/mg tissue, $p < 0.001$). No significant differences were detected between the CS animals and E20 animals. These results are presented in Figure 4.

Correlation analysis

As demonstrated in Table 2, the analysis between emphysema severity (evaluated by the number of crossed alveolar intercepts) and several variables showed high correlation values (body weight = 0.90, muscle weight = 0.77, CL = -0.97, TBARS = -0.65, carbonyl proteins = -0.99, and proteolytic activity = -0.89). In addition, chymotrypsin-like proteolytic activity and the oxidative variables also showed high correlation (CL = 0.97, TBARS = 0.97, and carbonyl proteins = 0.78).

DISCUSSION

Emphysema induces human skeletal muscle loss [3], reductions in locomotory skeletal muscle contractile function [28], lipid peroxidation, and alterations in the glutathione redox system in skeletal muscles of hamsters [2]; it also decreases skeletal muscle oxidative enzyme capacity in hamsters [10].

Our results showed significantly impaired crossed alveolar intercepts in E20 animals, which was worse in the E40 group. The comparison between E20 and E40 was also significantly different, showing injury enhancement on E40. The damaged lungs are shown in tissue micrographs in Figure 1. The total body weight and gastrocnemius muscle weight were decreased in the E20 group and were statistically significant in the E40 as compared to the CS group. The cachexia index was high in E20 animals, but higher in the E40 group. A positive correlation between emphysema severity and both body and muscle weight indicated a weak relationship between lung damage and cachexia.

Mechanisms underlying muscle wasting observed in several diseases remain largely unknown. Since ROS are demonstrated to be involved on cellular adaptation, recent studies in our laboratory [23] and others [2, 13] have demonstrated the involvement of oxidative stress in skeletal muscle loss. In the present study, concomitant muscle wasting and lipid peroxidation indicated that lipid peroxidation might be an important factor in the mechanism of muscle protein hyper-catabolism. Tert-butyl hydroperoxide-initiated CL was originally used to analyze the integrity of non-enzymatic antioxidant defenses and the levels of lipid hydroperoxides in muscle homogenates of animals inoculated with tumor cells. Previous studies using this assay indicated that the increase in CL is closely related to the oxidative stress previously suffered by the tissue. Oxidative stress induces the consumption of antioxidants and augments the formation of lipid hydroperoxides, which results in increased photon emission [24, 29]. We observed a strong association between chymotrypsin-like proteolytic activity and lipid peroxidation markers (CL and TBARS) in this emphysema model. It appears that ROS contribute to skeletal muscle dysfunction in a several ways. For example, Brotto and Nosek [30] demonstrated a blunted Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum, and Andrade et al. [31] demonstrated reduced Ca^{2+} sensitivity in skeletal muscles exposed to H_2O_2 . ROS have been implicated in enzymatic dysfunction within the glycolytic pathway, the citric acid cycle, and the electron transport system, suggesting that elevated ROS may impair cellular energetics within skeletal muscles [32]. In addition, Mattson et al. [2] demonstrated increased lipid peroxidation (evaluated by MDA levels) in gastrocnemius

muscles of hamsters with single-dose elastase-induced emphysema; these findings are in agreement with our results. Moreover, we further confirmed the association between oxidative stress and loss of muscle mass and proteolysis by using a sensitive CL method [24, 29, 33], which estimates the chain reaction of lipid peroxidation earlier, i.e., it measures both membrane lipid hydroperoxide formation and antioxidant depletion [34, 35]. Our results showed a progressive increase in TBARS and CL, which were strongly correlated with proteasomal proteolytic activity and increased tissue damage. In addition, progressive protein carbonylation was observed, which was well correlated with chymotrypsin-like proteolytic activity and lung tissue damage.

A previous study demonstrated that treatment of C₂C₁₂ myotube cells with FeSO₄/H₂O₂ caused a significant rise in MDA levels, with a concomitant increase in the catabolism of myofibrillary proteins and expression of the major components of the ubiquitin-proteasome pathway [36]. The authors suggested that mild oxidative stress increases protein degradation in skeletal muscles by causing upregulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in this *in vitro* model. In line with these findings, in the present study, chymotrypsin-like proteolytic activity was well correlated with CL, TBARS, and carbonyl proteins, and a reduction of body and muscle weight and an increase in emphysema severity were observed. It is worth considering that increased MDA levels are associated with increased proteolysis, which is related to carbonyl proteins levels. It is likely that when MDA or low-molecular-weight adducts are present, the level of oxidized proteins increases, and chymotrypsin-like proteolytic activity is accelerated, leading to muscle atrophy. Some authors have demonstrated that mild oxidative stress induces protein oxidation, with increased intracellular proteolysis [18, 37, 38]. Additionally, it has been postulated that mammalian cells are able to selectively remove moderately aldehyde-modified proteins from their intracellular protein pools and that the proteasomal system is responsible for this activity [36]. The bulk of oxidized proteins can be degraded by the proteasomal system [36, 39, 40], particularly those modified by aldehydes and peroxides [18, 37]. Of note, the assay employed in our study can be used to measure proteolysis related to 20S proteasome, and not only the proteasome connected to ubiquitin-marked proteins. The 20S proteasome is also important, as it can degrade oxidized proteins without ubiquitination [38]. Only Debigaré et al. [19] demonstrated that ubiquitination and proteolysis occur in the limb and respiratory muscles of patients with COPD, although no links were established between these processes and the oxidative status.

For the first time, the present study demonstrated that emphysema promotes body weight and skeletal muscle loss in a severity-dependent manner and is related to oxidative stress and chymotrypsin-like proteolytic activity. Additionally, oxidative stress variables and muscle proteolytic activity were well correlated. Thus, it is reasonable to assume that muscle atrophy observed in this model of emphysema is mediated by increased muscle proteolysis, with possible involvement of oxidative stress.

In summary, emphysema induces increased muscle loss, oxidative stress, contractile protein degradation, and chymotrypsin-like proteolytic activity in a lung injury-dependent manner. It is possible that this mechanism can help elucidate the skeletal muscle dysfunction in animal models of emphysema and also in human COPD patients, thus contributing to the establishment of therapeutic countermeasures against emphysema-induced muscle damage and cachexia.

CONCLUSIONS

Emphysema induces increased muscle loss, oxidative stress, contractile protein degradation, and chymotrypsin-like proteolytic activity in a lung injury-dependent manner. It is possible that this mechanism can help elucidate the skeletal muscle dysfunction in animal models of emphysema and also in human COPD patients, thus contributing to the establishment of therapeutic countermeasures against emphysema-induced muscle damage and cachexia.

LIST OF ABBREVIATIONS USED

COPD – chronic obstructive pulmonary disease; TBARS – thiobarbituric acid reactive substances; CL – chemiluminescence; MDA – malondialdehyde; ROS – reactive oxygen species; CS – control + saline; E20 – emphysema instilled with 20mg/mL of papain; E40 – emphysema instilled with 40mg/mL of papain; i.p. – intraperitoneally; $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ – monobasic potassium phosphate buffer; KCl – sodium chloride; TBA – thiobarbituric acid; RT – room temperature; DNPH – dinitrophenylhydrazine; HCl – chloridric acid; TCA – trichloroacetic acid; RLU – relative light units; BSA – bovine serum albumine; SEM – standart error mean; H_2O_2 – hydrogen peroxide; FeSO_4 – ferrous sulfate.

COMPETING INTERESTS

Author(s) declare that they have no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

JT carried out CL and MDA assays, and drafted the manuscript. ALC participated in the design of the study and performed the statistical analysis. CRB carried out carbonyl proteins assays and helped with CL data treatment. SSB carried out MDA and carbonyl protein data treatment, analysis and interpretation. RC was responsible for critical review and intellectual content. FAG conceived the study, and participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Post graduation Programmes) and Fundação Araucária [grant no. 418/2008]. We are very grateful to J. A. Vargas and Pedro R. S. Dionísio of the Departamento de Patologia Geral – Universidade Estadual de Londrina, for excellent technical assistance.

REFERENCES

- [1] Wüst RC, Degens H: **Factors contributing to muscle wasting and dysfunction in COPD patients.** *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007, **2**(3):289–300.
- [2] Mattson JP, Sun J, Murray DM, Poole DC: **Lipid peroxidation in the skeletal muscle of hamsters with emphysema.** *Pathophysiology* 2002, **8**(3):215–221.
- [3] Gosselink R, Troosters T, Decramer M: **Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **153**(3):976–980.
- [4] Maltais F, LeBlanc P, Simard C, Jobin J, Bérubé C, Bruneau J, Carrier L, Belleau R: **Skeletal muscle adaptation to endurance training in patients with chronic**

- obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **154**(2 Pt1):442–447.
- [5] Tada H, Kato H, Misawa T, Sasaki F, Hayashi S, Takahashi H, Kutsumi Y, Ishizaki T, Nakai T, Miyabo S: **31P-nuclear magnetic resonance evidence of abnormal skeletal muscle metabolism in patients with chronic lung disease and congestive heart failure.** *Eur Respir J* 1992, **5**(2):163–169.
- [6] Fusco LB, Pêgo-Fernandes PM, Xavier AM, Pazetti R, Rivero DHRF, Capelozzi VL, Jatene FB: **[Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína].** *J Pneumol* 2002, **28**(1):205–219.
- [7] Takaro T, White SM: **Emphysema.** *Am Rev Respir Dis* 1993, **108**:334–337.
- [8] Monteiro R, Jatene FB, Pazetti R, Correia AT, Manoel LA, Bernardo WA, Rivero DHRF, Oliveira AS: **[Avaliação das alterações morfológicas cardíacas secundárias ao enfisema pulmonar: estudo experimental em ratos].** *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2004, **19**(4):341–347.
- [9] Fermoselle C, Sanchez F, Barreiro E: **Reduction of muscle mass mediated by myostatin in an experimental model of pulmonary emphysema.** *Arch Bronconeumol* 2011, **47**(12):590-598.
- [10] Mattson JP, Poole DC: **Pulmonary emphysema decreases hamster skeletal muscle oxidative enzyme capacity.** *J Appl Physiol* 1998, **85**(1):210–214.
- [11] Barnes PJ: **Reactive oxygen species and airway inflammation.** *Free Radic Biol Med* 1990, **9**(3):235–243.
- [12] Supinski G, Nethery D, Stofan D, DiMarco A: **Effect of free radical scavengers on diaphragmatic fatigue.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997, **155**(2):622-629.
- [13] Powers SK, Duarte J, Kavazis AN, Talbert EE: **Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation.** *Exp Physiol* 2010, **95**(1):1–9.

- [14] Smuder AJ, Min K, Hudson MB, Kavazis AN, Kwon OS, Nelson WB, Powers SK: **Endurance exercise attenuates ventilator-induced diaphragm dysfunction.** *J Appl Physiol* 2012, **112**(3):501-510.
- [15] Lee Y, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, Smuder AJ, Willis WT, Powers SK: **Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia-reperfusion injury.** *Med Sci Sports Exerc* 2012, **44**(3):397-405.
- [16] Powers SK, Smuder AJ, Criswell DS: **Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy.** *Antioxid Redox Signal* 2011, **15**(9):2519-2528.
- [17] Li YP, Chen Y, Li AS, Reid MB: **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* 2003, **285**:C806–C812.
- [18] Grune T, Davies KJ: **The proteasomal system and HNE-modified proteins.** *Mol Aspects Med* 2003, **24**(4–5):195–204.
- [19] Debigaré R, Côté CH, Maltais F: **Ubiquitination and proteolysis in limb and respiratory muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Proc Am Thorac Soc* 2010, **7**(1):84–90.
- [20] Mattson JP, Delp MD, Poole DC: **Differential effects of emphysema on skeletal muscle fibre atrophy in hamsters.** *Eur Respir J* 2004, **23**(5):703–707.
- [21] Mattson JP, Miller M, Poole DC, Delp MD: **Fiber composition and oxidative capacity of hamster skeletal muscle.** *J Histochem Cytochem* 2002, **50**(12):1685–1692.
- [22] Reznick AZ, Packer L: **Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay.** *Methods Enzymol* 1994, **233**:357–363.
- [23] Guarnier FA, Cecchini AL, Suzukawa AA, Maragno ALGC, Simão ANC, Gomes MD, Cecchini R: **Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor.** *Muscle Nerve* 2010, **42**(6):950–958.

- [24] Oliveira FJA, Cecchini R: **Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi***. *J Parasitol* 2000, **86**(5):1067–1072.
- [25] Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A: **Hydroperoxide initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle**. *Free Rad Biol Med* 1991, **10**:93–100.
- [26] Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the folin phenol reagent**. *J Biol Chem* 1951, **193**:265–275.
- [27] Miller GL: **Protein determination for larger numbers of samples**. *Anal Chem* 1959, **31**:964–968.
- [28] Mattson JP, Martin JC: **Emphysema-induced reductions in locomotory skeletal muscle contractile function**. *Exp Physiol* 2005, **90**(4):519–525.
- [29] Barbosa DS, Cecchini R, El Kadri MZ, Rodriguez MA, Burini RC, Dichi I: **Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids**. *Nutrition* 2003, **19**(4):1–83.
- [30] Brotto MA, Nosek TM: **Hydrogen peroxide disrupts Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibers**. *J Appl Physiol* 1996, **81**(2):731–737.
- [31] Andrade FH, Reid MB, Allen DG, Westerblad H: **Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse**. *J Physiol* 1998, **509**:565–575.
- [32] Andersson U, Leighton B, Young ME, Blomstrand E, Newsholme EA: **Inactivation of aconitase and oxoglutarate dehydrogenase in skeletal muscle in vitro by superoxide anions and/or nitric oxide**. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **249**(2):512–516.
- [33] Zimiani K, Guarnier FA, Miranda HC, Watanabe MAE, Cecchini R: **Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to**

- ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence.** *Nitr Ox Biol Chem* 2005, **13**:196–203.
- [34] Zamburlini A, Maiorino M, Barbera P, Pastorino AM, Roveri A, Cominacini L, Ursini F: **Measurement of lipid hydroperoxides in plasma lipoproteins by high-sensitive “single photon counting” luminometer.** *Biochim Biophys Acta* 1995, **1256**:233–240.
- [35] Llesuy SF, Meilei J, Gonzalez-Flecha BS, Boveris A: **Myocardial damage inducing by doxorubicin: hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology.** *Free Rad Biol Med* 1990, **8**:25–64.
- [36] Gomes-Marcondes MCC, Tisdale MJ: **Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress.** *Cancer Lett* 2002, **180**:69–74.
- [37] Grune T, Reinheckel T, Joshi M, Davies KJA: **Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress.** *J Biol Chem* 1995, **270**(5):2344–2351.
- [38] Davies KA: **Degradation of oxidized proteins by 20S proteasome.** *Biochimie* 2001, **83**:301–310.
- [39] Mastrocola R, Reffo P, Penna F, Tomasinelli CE, Boccuzzi G, Baccino FM, Aragno M, Costelli P: **Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress.** *Free Rad Biol Med* 2008, **44**:584–593.
- [40] Shang F, Gong X, Taylor A: **Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress.** *J Biol Chem* 1997, **272**(37):23086–23093.

TABLES AND CAPTIONS

Table 1 - Animal and skeletal muscle adaptation characteristics.

	CS	E20	E40
Crossed Alveolar Intercept	94.36 ± 7.3	60.52±2.8*	52.27 ± 4.7*,†
Total body weight (g)	171.6±15.9	157.5±10.3	137.4±7.2*,†
CI (%)	---	6.28±0.91	9.45±0.76
Gastrocnemius weight (mg)	251.87±24.87	230.12±23.52	197.87±10.49*,†
% of variation on gastrocnemius (compared with CS)	---	-8.6	-21.4

CS – Group instilled with 300 µL of NaCl 0.9%; E20 – Group instilled with 300 µL of papain 20 mg/mL in NaCl 0.9%; E40 – Group instilled with 300 µL of papain 40 mg/mL in NaCl 0.9%. CI – Cachexia index = (initial body weight – final body weight + body mass gain of CS group) / (initial body weight – body mass gain of CS group) x 100. *p<0.05 when compared with CS and †p<0.05 when compared with E20 by One way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

Table 2 - Some of correlations presented between emphysema severity, proteolytic activity and oxidative stress variables.

	Body weight loss	Gastrocnemius weight	TBARS	Carbonyl proteins	Lipid peroxidation by CL	<i>Proteolytic activity</i>
<i>Emphysema severity</i>	0.90	0.77	-0.65	-0.99*	-0.97*	-0.89*
<i>Proteolytic activity</i>	-0.99*	-0.99*	0.97	0.78	-0.97*	-

TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances. Positive values mean positive correlation; negative values mean negative correlation, as evaluated by Pearson's correlation test. *p<0.05.

Figure 1 - Histological images from lungs of papain- and saline-treated hamsters. (A) control + saline (CS): animals treated with approximately 0.3 mL of saline only; (B) emphysema 20 mg/mL (E20): animals treated with approximately 0.3 mL of 20 mg/mL papain in saline; and (C) emphysema 40 mg/mL (E40): animals treated with approximately 0.3 mL of 40 mg/mL papain in saline. Animals were euthanized after 60 days. Hematoxylin and eosin (H & E) images are shown at 50× magnification. Alveolar destruction was determined by the number of times that a predetermined group of coherent lines (1.25 mm² of total area and 1.50 mm of total length) crossed the parenchymal structures. The lesser these structures are crossed, the more extensive is the lesion.

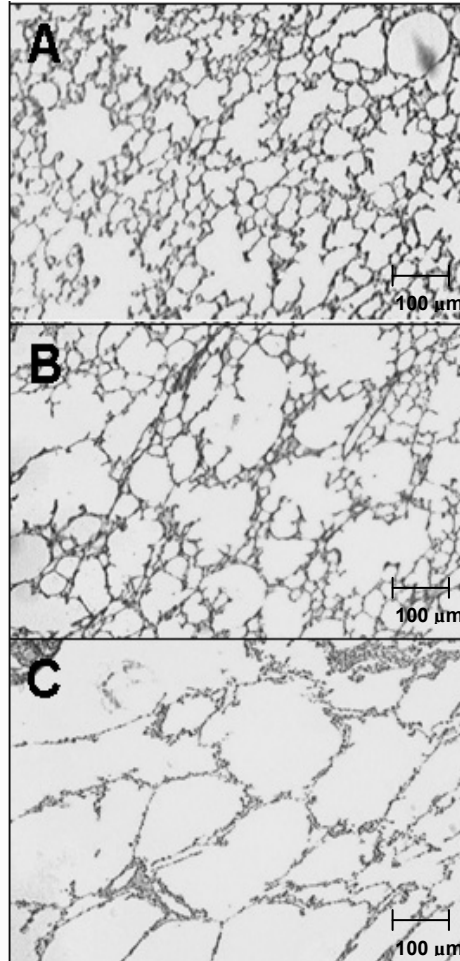


Figure 2 - Effect of muscle loss on gastrocnemius muscle lipid hydroperoxide and antioxidant levels in emphysemic hamsters and controls. Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence was monitored continuously for 40 min. The area under the curve for each animal was determined for comparisons between groups. The bars represent the means of 8 animals. Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test, with $p < 0.05$ considered significant.

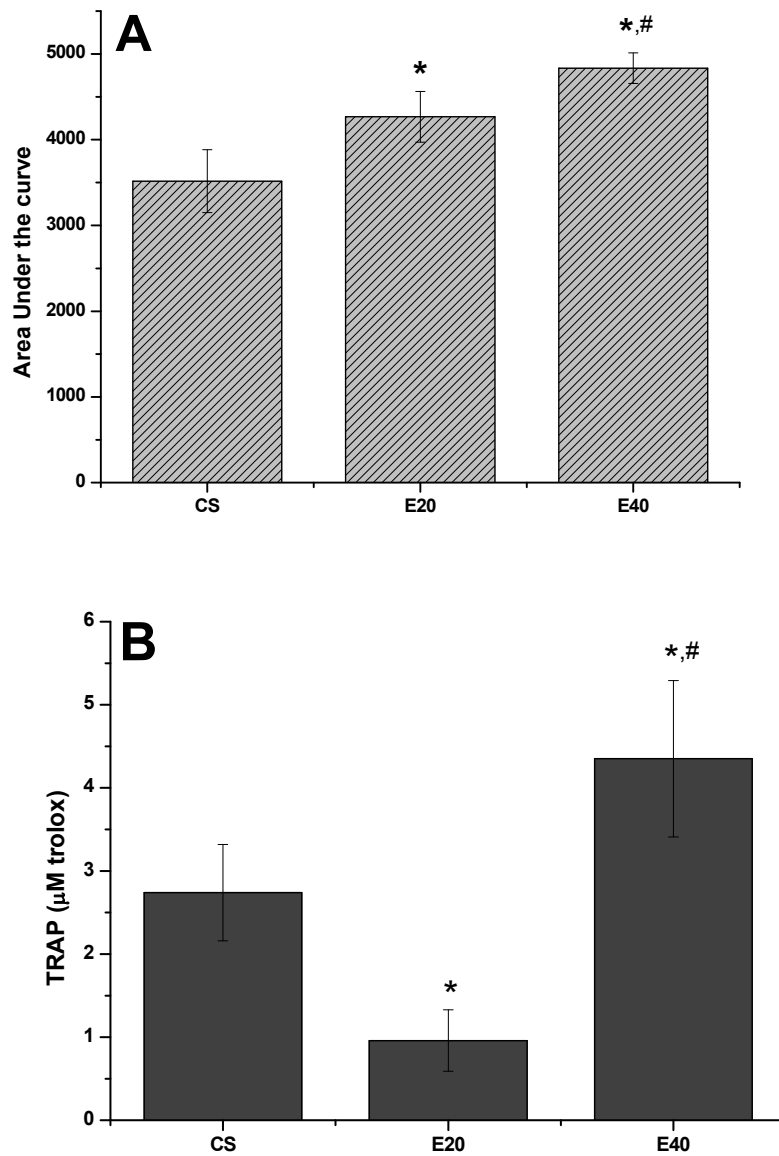


Figure 3 - Effect of emphysema on skeletal muscle in terms of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and carbonyl proteins in hamsters. (A) TBARS levels in muscle homogenates of hamsters treated with 2 different doses of papain. (B) Levels of protein carbonylation in muscle homogenates from control and emphysema hamsters. Results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM; n = 8). Statistical differences were detected by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Control + saline (CS): animals treated with approximately 0.3 mL of saline only; emphysema 20 mg/mL (E20): animals treated with approximately 0.3 mL of 20 mg/mL papain in saline; and emphysema 40 mg/mL (E40): animals treated with approximately 0.3 mL of 40 mg/mL papain in saline.

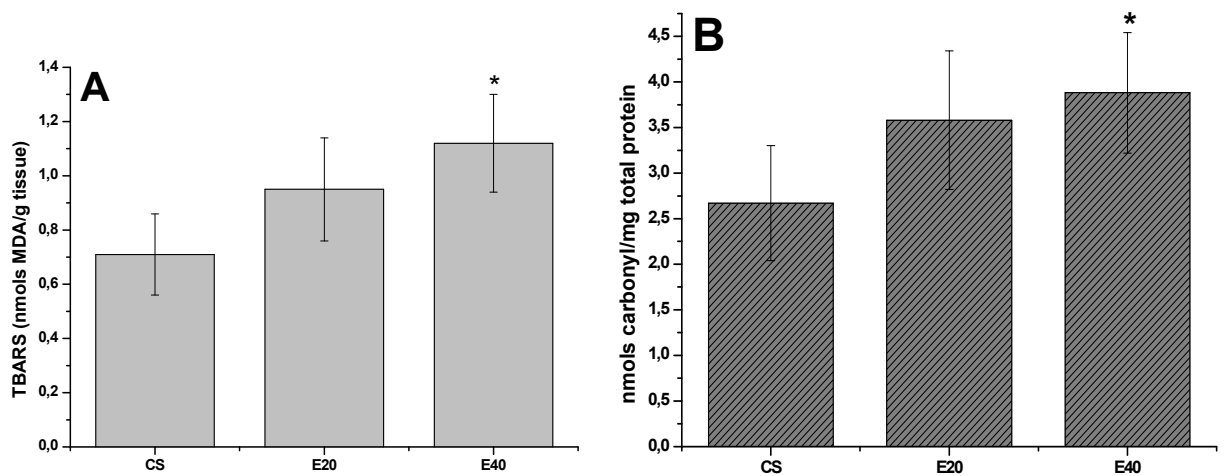


Figure 4 - Chymotrypsin-like proteolytic activity was evaluated in the gastrocnemius muscle of hamsters subjected to intratracheal instillation of papain or saline. * $p < 0.001$ to CS; # $p < 0.001$ relative to E20, as detected by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

