



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THAMARA NISHIDA XAVIER DA SILVA

**MODIFICAÇÕES PROMOVIDAS EM MIOBLASTOS E
MIOTUBOS DA LINHAGEM C2C12 FRENTE À GERAÇÃO
DE ÂNION SUPERÓXIDO:
ALTERAÇÃO DO BALANÇO REDOX, ATIVIDADE CELULAR
E INDUÇÃO DE VIAS PROTEOLÍTICAS**

THAMARA NISHIDA XAVIER DA SILVA

**MODIFICAÇÕES PROMOVIDAS EM MIOBLASTOS E
MIOTUBOS DA LINHAGEM C2C12 FRENTE À GERAÇÃO
DE ÂNION SUPERÓXIDO:
ALTERAÇÃO DO BALANÇO REDOX, ATIVIDADE CELULAR
E INDUÇÃO DE VIAS PROTEOLÍTICAS**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Alessandra Guarnier.

Londrina
2016

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

Silva, Tamara Nishida Xavier .

Modificações promovidas em mioblastos e miotubos da linhagem C2C12 frente à geração de ânion superóxido: alteração do balanço redox, atividade celular e indução de vias proteolíticas. / Tamara Nishida Xavier Silva. - Londrina, 2016.

58 f. : il.

Orientador: Flávia Alessandra Guarnier.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

THAMARA NISHIDA XAVIER DA SILVA

**MODIFICAÇÕES PROMOVIDAS EM MIOBLASTOS E MIOTUBOS DA
LINHAGEM C2C12 FRENTE À GERAÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO:
ALTERAÇÃO DO BALANÇO REDOX, ATIVIDADE CELULAR E
INDUÇÃO DE VIAS PROTEOLÍTICAS**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Alessandra
Guarnier.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Ilce Mara de Syllós Cólus
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 11 de Abril de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de iniciar e concluir o meu mestrado. Por toda força para superar cada etapa, ajudando em cada problema e limitação pelo caminho. Agradeço também por todas as pessoas que colocou na minha vida nos momentos em que eu mais precisei.

Agradeço à minha família, por todo apoio e suporte durante o mestrado, aos meus pais irmãos e sobrinhos. Principalmente à minha mãe que nunca parou de me incentivar. Se eu cheguei até aqui, foi graças a vocês.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Flávia Alessandra Guarnier, pela orientação neste trabalho, principalmente pelas oportunidades, ensinamento e dedicação.

À banca examinadora, Glaura e Ilce por aceitarem gentilmente fazer parte da minha banca examinadora e por toda pela revisão e colaboração no trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Patológicas da UEL, Jesus e Pedro, por toda colaboração durante minha permanência neste. Por tudo que me ensinaram e por toda ajuda e companhia ao longo dos anos. Por todo esforço para que tudo saia da melhor maneira e o laboratório seja melhor.

À professora Dr^a. Alessandra Lourenço Cecchini Armani, minha primeira orientadora na graduação, uma pessoa muito especial para mim, que sempre me incentivou. Ao professor Dr. Rubens Cecchini por todo seu conhecimento e apoio sempre. Agradeço também aos professores Rodrigo Cabral Luiz e Jair Tonon por todo o apoio. E a todos os professores da pós-graduação que contribuíram para minha formação.

Aos amigos de laboratório, por toda ajuda e companhia ao longo dos anos. Cada um ajudou e tornou tudo isso muito mais fácil. Agradeço a Sara Bernardes, Laís Sábio, Thâmara Alves, Jean Kremer, Fernando Pinheiro, Nichelle Antunes, Fernando Borges, Fernanda Blegniski, Kaliana Machado, Ana Carolina Conchon Costa, Iriana Carrara, Gabriela P. Melo, Cássio Nunes, Larissa Juliani Sanches, Heloíza Bordini, Natália Medeiros e Walison Brito por toda convivência, compreensão e ajuda ao longo dos anos. Em particular agradeço à Poliana Camila Marinello, uma grande amiga que em todos os momentos me ajudou, incentivou e contribuiu para a realização deste trabalho. Por tudo que me ensinou e aconselhou nestes anos.

Agradeço aos meus amigos Lucas Shimomura, Lucina Higachi e Carolina Prado por toda amizade, ajuda e apoio neste trabalho e ao longo do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (*CAPES*) pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, por tudo que me ensinaram ao longo dos anos e por todos os momentos em que passamos juntos.

SILVA, Thamara Nishida Xavier. **Modificações promovidas em mioblastos e miotubos da linhagem C2C12 frente à geração de ânion superóxido**: alteração do balanço redox, atividade celular e indução de vias proteolíticas. 2016. 58 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual De Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) pode levar ao estresse oxidativo (EO) quando não compensado pelos sistemas antioxidantes. Muitas evidências indicam que mesmo um pequeno aumento das ERO pode desempenhar um papel importante na adaptação do músculo esquelético. Já foi demonstrado que o EO pode levar a modificações oxidativas, que levam a ativação de vias de degradação. Entretanto, a maior parte dos estudos *in vitro* utiliza o peróxido de hidrogênio como sistema gerador de ERO. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito de várias concentrações do radical superóxido na atividade metabólica, mudanças oxidativas e vias de proteólise em cultura de mioblastos e miotubos da linhagem C2C12, precursores de células musculares de camundongos. Anteriormente aos experimentos, foi realizada uma padronização do modelo. Foram utilizados mioblastos e miotubos C2C12, expostos à diferentes doses de pirogalol nas concentrações de 50 µM, 100 µM, 250 µM e 500 µM por 30min. Para investigar a influência do tratamento na citotoxicidade foram realizados testes de viabilidade e atividade metabólica, MTT e vermelho neutro. Para avaliação das defesas antioxidantes intracelulares foi realizada a determinação da concentração de tióis totais. A peroxidação lipídica foi avaliada por quimiluminescência (QL) estimulada por terc-butil. Os efeitos oxidativos em proteínas foram avaliados por meio do conteúdo de proteínas carboniladas por ELISA, e a proteólise por QL. A padronização resultou nas condições adequadas para que os experimentos pudessem ser realizados. Os resultados nos mioblastos mostram que a viabilidade celular, os tióis totais e proteínas carboniladas não apresentaram diferença em nenhuma das concentrações. A concentração de 500 µM foi capaz de diminuir a atividade metabólica no MTT e aumentar a lipoperoxidação na QL. No vermelho neutro a atividade foi diminuída nas concentrações de 250 e 500 µM. A diferença na proteólise não foi considerada estatisticamente significativa. Nos miotubos, nenhuma concentração foi capaz de diminuir a viabilidade celular, ou modificar MTT, tióis totais e lipoperoxidação. A concentração de 500 µM diminuiu a atividade do vermelho neutro. Concentrações a partir de 100 µM aumentaram as concentrações de proteínas carboniladas. Nenhuma alteração ocorreu na atividade da proteólise em miotubos. O ânion superóxido influencia no metabolismo celular e nos parâmetros redox das células. Apesar das vias de degradação não aumentarem foi possível avaliar as alterações iniciais que podem levar a adaptação da célula muscular quando submetidas a exposição à ERO.

Palavras-chave: Superóxido. C2C12. Estresse oxidativo. Músculo esquelético.

SILVA, Thamara Nishida Xavier. **Changes promoted in myoblasts and myotubes from C2C12 cell line exposed to generation of superoxide anion: modification of the redox balance, cellular activity and induction of proteolytic pathways.** 2016. 58 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The increase in reactive oxygen species (ROS) can lead to oxidative stress (OS) when not counterbalanced by the antioxidant systems. Many evidences indicate that increased ROS plays an important role in the regulation of signaling pathways that are necessary to promote adaptation of skeletal muscle. It has been demonstrated that the OS causes oxidative modifications which lead to activation of degradation pathways. However, most studies *in vitro* use hydrogen peroxide as ROS stimulus. The objective of this study was to investigate the effect of various superoxide radical concentrations in metabolic activity, oxidative modifications and proteolysis pathways in C2C12 culture. Prior to the experiments, a standardization of the model conditions was performed. C2C12 myoblasts and myotubes were exposed to different concentrations of pyrogallol, 50 μM , 100 μM , 250 μM and 500 μM , for 30min. To investigate the influence of treatment on the cytotoxicity, viability tests were carried out and analysis of metabolic activity, neutral red and MTT. For evaluation of intracellular antioxidant defenses was performed the determination of total thiols. Lipid peroxidation was assessed by chemiluminescence (CL) stimulated tert-butyl. The protein oxidative effects were assessed by carbonyl protein content by ELISA and proteolysis by CL. The standardization resulted in appropriate conditions to enable the experiments to be performed. The results showed that the myoblasts viability, total thiol and protein carbonyls did not differ in any of the concentrations. The concentration of 500 μM was able to decrease the MTT activity and increase the lipoperoxidation in CL. Neutral red activity was decreased at concentrations of 250 and 500 μM . The activity of proteolysis appears to increase with the dose but the difference was not significant. In myotubes, no concentration was able to alterate the viability, MTT, total thiols and lipid peroxidation. The concentration of 500 μM decreased the activity of neutral red. With the exception of the concentration of 50 μM , all other concentrations increased protein carbonyls. No change occurred in the proteolysis activity in myotubes. The superoxide anion influences in the metabolism and redox parameters of the cells. Although degradation pathways was not increased, it was possible to evaluate the initial changes that can lead to adaptation of the muscle cells when subjected to exposure to ROS.

Keywords: Superoxide. C2C12. Oxidative stress. Skeletal muscle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Produção de espécie reativas de oxigênio.....	11
Figura 2	– Primeiras etapas da auto-oxidação do pirogalol	16
Figura 3	– Auto-oxidação do pirogalol.....	16
Figura 4	– Estrutura do músculo esquelético	18
Figura 5	– Efeito das de vias proteolíticas e ativação pelas espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético.....	21
Figura 6	– Formação da fibra muscular	22
Figura 7	– Curva da auto-oxidação do pirogalol em tampão e em meio de cultura, na presença ou ausência de soro fetal bovino	25
Figura 8	– Curva da auto-oxidação do pirogalol em diferentes concentrações finais (50, 100, 250, 500 e 1000 uM).	25
Figura 9	– Auto-oxidação do pirogalol na presença dos antioxidantes tiron e superóxido dismutase (SOD).	26
Figura 10	– Inibição da auto-oxidação do pirogalol na presença de Tiron em diferentes concentrações (0,05; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 e 10mM) a 420 nm.	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cu ⁺	Cobre
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EO	Estresse Oxidativo
ER	Espécies reativas
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas do Oxigênio
GSH	Glutathiona Reduzida
Fe ²⁺	Ferro
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
KO ₂	Superóxido de Potássio
MDA	Malondialdeído
(Me ₄ N)O ₂	Superóxido de Tetrametilamônio
NADH	Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NF-κB	Fator nuclear-kappa B
NO•	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O ₂ •	Superóxido
O ₃	Ozônio
OH•	Hidroxil
RL	Radicais Livres
RO•	Alcoxil
ROO•	Peroxil
RS	Retículo Sarcoplasmático
SH	Sulfidrila
SOD	Superóxido Dismutase
XO	Xantina Oxidase

SUMÁRIO

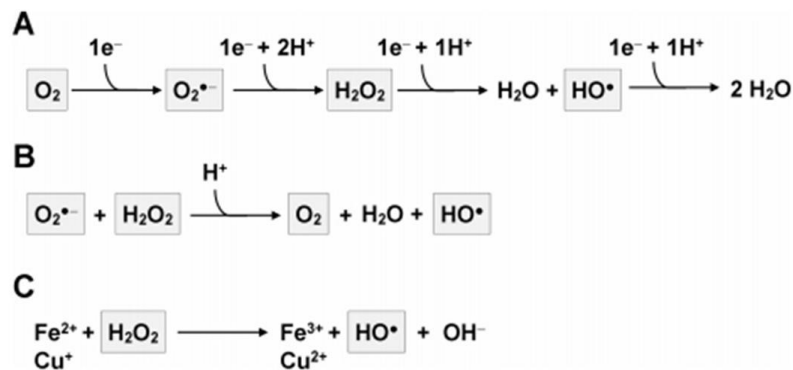
1	INTRODUÇÃO	10
1.1	ÂNION SUPERÓXIDO.....	14
1.2	MÚSCULO ESQUELÉTICO	17
1.2.1	Estrutura do Músculo Esquelético	17
1.2.2	Espécies reativas no músculo estriado esquelético	18
1.2.3	Cultura de célula C2C12	21
1.2.4	Resultados preliminares do delineamento	24
2	HIPÓTESES	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	30
5	CONCLUSÕES	31
	REFERÊNCIAS	32
	APÊNDICE A – SUPEROXIDE INDUCES DIFFERENT METABOLIC AND OXIDATIVE MODIFICATIONS IN C2C12 MYOBLASTS AND C2C12 MYOTUBES	37

1 INTRODUÇÃO

No metabolismo celular aeróbio são formados continuamente inevitáveis subprodutos como os radicais livres (RL) e outros compostos oxidativos e nitrosativos que são considerados altamente reativos (BACHI *et al.*, 2013). RL são espécies químicas capazes de existência independente, e que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência. Estas espécies possuem alta afinidade por moléculas biológicas, que podem reagir criando assim novos radicais até a sua estabilização. Espécies reativas (ER) é um termo genérico que abrange tanto os radicais livres, como outras substâncias reativas na forma molecular como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HOCl) e o ozônio (O_3). Quando espécies reativas são provenientes do oxigênio, são chamadas de espécies reativas do oxigênio (ERO), e quando provenientes do nitrogênio, espécies reativas de nitrogênio (ERN). Ainda, podem ser diretamente derivadas de outros elementos como cloro, bromo e enxofre (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A maioria das células funcionam com valores fisiológicos de ERO e ERN, estas espécies são produzidas de maneira controlada através de diferentes mecanismos (BACHI *et al.*, 2013). Em baixas concentrações as ERO e ERN são utilizadas para vias de sinalização (sinalização redox), expressão gênica e ainda eliminação de patógenos (HOHN *et al.*, 2013).

A principal fonte endógena de ERO durante o metabolismo basal e em parte de processos de adaptação celular é o metabolismo mitocondrial. Durante a cadeia de transporte de elétrons, a redução parcial do oxigênio pode ocorrer, levando à geração do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (HOHN *et al.*, 2013). O superóxido pode ser reduzido a H_2O_2 (por meio da ação da enzima superóxido dismutase - SOD), que reage então com outra molécula de $O_2^{\cdot-}$, via reação de Haber-Weiss, e gera o radical hidroxil (OH^{\cdot}). Ainda na presença de Fe^{2+} ou Cu^+ , o peróxido de hidrogênio pode gerar OH^{\cdot} via reação de Fenton (Figura 1). ER também são produzidas em outras organelas como o retículo endoplasmático, lisossomos, peroxissomos, entre outras, e ainda por enzimas citoplasmáticas por reações de óxido-reduções fisiológicas (BACHI *et al.*, 2013).



1
2 **Figura 1 – Produção de espécie reativas de oxigênio. (A) Redução parcial e total do oxigênio. (B)**
3 **Reação de Haber-Weiss. (C) Reação de Fenton.**

4 **Fonte:** BACHI *et al.* (2013)
5

6 Para remover as ERO as células possuem defesas antioxidantes enzimáticas
7 e não enzimáticas. Dentre as enzimáticas, encontram-se a superóxido dismutase
8 (SOD), que catalisa a dismutação do superóxido à H₂O₂; a catalase, que reduz o
9 peróxido de hidrogênio à água e oxigênio; e a glutathiona peroxidase, capaz de reduzir
10 o H₂O₂ e outros peróxidos orgânicos. Além destas, outras enzimas também participam
11 da remoção de radicais livres ou da consequência de sua ação, como a glutathiona
12 redutase, tioredoxina redutase, peroxirredoxina, entre outras. Além das enzimas, as
13 células também contam com moléculas antioxidantes não enzimáticas, substâncias
14 de baixa massa molecular produzidas endogenamente que serão oxidadas com a
15 finalidade de estabilizar as ER. Dentre elas, podem ser citadas a glutathiona reduzida
16 (GSH - um tripeptídeo com grupamento tiol), a transferrina, lactoferrina, bilirrubina,
17 ácido úrico, ácido lipóico e outros. Existem ainda outras substâncias antioxidantes
18 adquiridas por meio da dieta: como exemplo o alfa-tocoferol, o ácido ascórbico e os
19 carotenoides. A composição das defesas antioxidantes varia entre tecidos e tipos
20 celulares. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; POWERS; JI, *et al.*, 2011).

21 Denomina-se estresse oxidativo (EO) o desequilíbrio entre a produção de
22 espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE,
23 2007). O EO resulta em danos diretos ou indiretos a ácidos nucleicos, proteínas e
24 lipídios. No entanto, o envolvimento de ERO na patogênese das doenças não se limita
25 apenas ao dano macromolecular (RAY *et al.*, 2012). Muitos estudos indicam que as
26 ERO são importantes mensageiros das vias de sinalização redox envolvidas em
27 diferentes mecanismos fisiológicos (ALLEN; TRESINI, 2000; BACHI *et al.*, 2013;
28 HURD; MURPHY, 2009; POWERS *et al.*, 2010; RAY *et al.*, 2012). As ER são capazes,
29 por exemplo, de controlar a atividade de várias quinases e fosfatases, o que pode

1 levar a ativação de fatores de transcrição, como por exemplo o fator de transcrição
2 nuclear κ -B (NF- κ B) (POWERS *et al.*, 2010).

3 Assim, conclui-se que o estresse oxidativo em si pode levar a diferentes
4 consequências para diferentes célula, mesmo quando moderadamente aumentado.
5 Esses efeitos podem ocorrer isoladamente ou em conjunto, dependendo do tipo
6 celular afetado ou da severidade do estresse oxidativo. Entre esses efeitos são
7 listados aumento da proliferação celular, indução da produção e mobilização de
8 antioxidantes, lesão ou senescência celular, ou controle da morte celular
9 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

10 Entre os alvos mais importantes para o dano oxidativo estão os lipídios. A
11 lipoperoxidação, especialmente de lipídios de membrana, é um dos mecanismos
12 proposto na teoria dos radicais livres do envelhecimento, os produtos de oxidação
13 lipídica podem funcionar na sinalização celular e causar adaptações (AYALA *et al.*,
14 2014).

15 Ainda, os danos oxidativos conseguem afetar lipídios de membrana de
16 organelas, como mitocôndria e lisossomo, isso pode levar desestabilização da
17 membrana e culminar na disfunção dessas organelas. Essa disfunção tem diferentes
18 resultados, a desestabilização parcial da membrana leva à ativação da proteólise
19 (liberação de cálcio) ou à sinalização apoptótica (liberação de catepsinas e citocromo
20 c), enquanto a ruptura completa induz à necrose com a liberação de vários
21 componentes dessas organelas (APPELQVIST *et al.*, 2013; BARBOUR; TURNER,
22 2014).

23 As proteínas são um grande alvo das ERO e ERN devido à sua grande
24 quantidade na célula, tanto estrutural como funcional. Alguns tipos celulares, como o
25 músculo esquelético, são particularmente mais sensíveis neste aspecto devido à
26 altíssima dependência de proteínas funcionais durante o trabalho celular. Algumas
27 proteínas são alvos de reações oxidativas reversíveis para que executem a sua
28 função. Dependendo da intensidade, natureza da ER ou do tempo de exposição de
29 uma proteína ao estresse oxidativo, proteínas celulares (constitutivas ou não) podem
30 sofrer danos oxidativos irreversíveis, que significa obrigatoriamente alteração da sua
31 conformação nativa, e perda de função (BACHI *et al.*, 2013; BUTTERFIELD; DALLE-
32 DONNE, 2014; HOHN *et al.*, 2013). As formas de ataque a uma proteína por ER
33 incluem ataque direto ao seu esqueleto ou às suas cadeias laterais de aminoácidos,
34 ou ainda ataque indireto por produtos secundários de oxidação, como alguns produtos

1 da peroxidação lipídica (p.ex. malondialdeído e 4-hidroxi-2-nonenal) ou produtos de
2 glicação (p. ex. carboidratos oxidados e produtos finais da glicação avançada)
3 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HOHN *et al.*, 2013).

4 A susceptibilidade das proteínas e aminoácidos à oxidação também varia de
5 acordo com a ER. Os aminoácidos histidina, leucina, metionina e cisteína, assim como
6 os aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, são mais suscetíveis aos danos
7 oxidativos/nitrosativos que outros (HOHN *et al.*, 2013). Desta forma, proteínas que
8 possuem altas quantidades destes aminoácidos possuem maior sensibilidade a
9 processos oxidativos. O H_2O_2 , o óxido nítrico (NO^*) e o $O_2^{\cdot-}$, em condições e
10 concentrações fisiológicas, têm pouco efeito direto sobre as proteínas. Entretanto,
11 estes radicais podem ter efeito mais significativo em proteínas específicas. O H_2O_2
12 tem uma preferência por grupamento sulfidrilas (-SH), enquanto a maioria das
13 proteínas que reagem com o superóxido possuem Fe^{2+} em sua estrutura
14 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HURD; MURPHY, 2009).

15 Com a persistência do processo de oxidação proteica, ocorre oxidação
16 avançada, que pode levar ao desdobramento da proteína com formação de
17 agregados. As células permanentes, como neurônios e células musculares, são
18 particularmente mais afetadas. Quando o processo de oxidação é menos avançado
19 pode acontecer o reparo por meio de enzimas específicas que normalmente agem
20 como redutases ou ainda degradação por proteólise, o que acontece com maior
21 frequência (HOHN *et al.*, 2013).

22 Entre as modificações proteicas irreversíveis, que conseqüentemente levam
23 aumento da proteólise, a mais abundante é a formação de grupamentos carbonílicos.
24 O processo pode ser resultado de ataque direto por ER ou, como mencionado
25 anteriormente, por meio da reação de proteínas constitutivas com subprodutos de
26 lipoperoxidação, glicação ou derivados de proteínas e peptídeos oxidados (BACHI *et al.*,
27 2013; BARREIRO; HUSSAIN, 2010). As proteínas carboniladas são resultado de
28 um dano oxidativo mais intenso e, devido à sua estabilidade, são importantes
29 marcadores de estresse oxidativo (ALAMDARI *et al.*, 2005; DALLE-DONNE *et al.*,
30 2003). Outros produtos de oxidação também podem ser utilizados como marcadores
31 de EO, como a 3-nitrotirosina (MURAKAMI *et al.*, 2012) e proteínas tioladas
32 (GIUSTARINI *et al.*, 2012). Os principais sistemas proteolíticos na célula incluem
33 proteases lisossomais (catepsinas), caspases, proteases dependentes de cálcio
34 (calpaínas) e proteases multicatalíticas do sistema proteossomal (20S e 26S) (DALLE-

1 DONNE *et al.*, 2006). As proteínas oxidadas podem ativar os sistemas proteolíticos,
2 ou ainda as ER podem ativar diretamente as vias de degradação proteica por
3 mecanismos de sinalização (POWERS *et al.*, 2010).

4 Como citado anteriormente, sinais redox, por efeito de oxidantes ou
5 antioxidantes, podem anular ou aumentar a atividade de proteínas alvo e ainda estão
6 envolvidos em processos de comunicação fisiológicos celulares que incluem
7 sinalização via proteínas quinases, função de canais de membranas, cascata
8 proteolítica da apoptose e regulação da transcrição (BACHI *et al.*, 2013). Dentro
9 desse contexto, o peróxido de hidrogênio é a ER mais estudada e utilizada para
10 investigação da sinalização redox em sistemas de cultura de células. A molécula age
11 especificamente e reversivelmente, modificando proteínas, principalmente os tióis
12 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A maior parte do peróxido presente em meio
13 intracelular é proveniente da dismutação do superóxido (HURD; MURPHY, 2009).
14 Poucos estudos utilizam os efeitos da geração de um radical primário, como o ânion
15 superóxido, em sistemas de cultura de células.

16 O ânion superóxido é uma espécie reativa de oxigênio diretamente associada
17 com o início do estresse oxidativo (AFANAS'EV, 2005; SCHIEBER; CHANDEL, 2014).
18 Este radical livre tem demonstrado envolvimento direto com a sinalização redox
19 (DAIBER, 2010). Algumas proteínas sensíveis à inativação pelo superóxido são
20 capazes de ativar vias de sinalização envolvidas com adaptação quando expostas a
21 elevadas concentrações dessa ER, ou ainda iniciar a morte celular (AFANAS'EV,
22 2005; SCHIEBER; CHANDEL, 2014), demonstrando assim a importância de investigar
23 os efeitos diretos do ânion em tipos celulares particularmente sensíveis à atividade
24 mitocondrial ou metabólica como as células musculares.

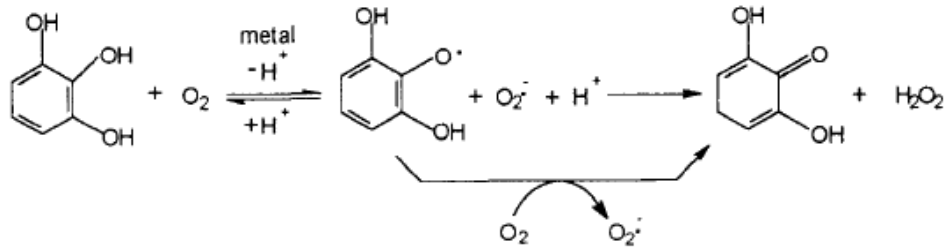
25 26 1.1 ÂNION SUPERÓXIDO

27 O superóxido é produzido pela adição de um único elétron ao oxigênio
28 molecular o que ocorre em vários locais intracelulares. A sua geração intracelular é
29 mediada principalmente por enzimas, como NADPH (nicotinamida adenina
30 dinucleotídeo fosfato) oxidase e xantina oxidase (XO), por algumas reações de
31 autooxidação, por proteínas do grupo heme, pelo retículo endo/sarcoplasmático,
32 lisossomo, peroxissomos ou pela mitocôndria, local de maior produção. Os principais
33 locais de produção do $O_2^{\cdot-}$ nas mitocôndrias são os complexos I (NADH desidrogenase
34 ou NADH ubiquinona oxidoreductase) e III (citocromo C: ubiquinona oxidoreductase) da

1 cadeia de transporte de elétrons. Em níveis basais, aproximadamente 1% de todo o
2 oxigênio consumido nas mitocôndrias é desviado para a geração de superóxido.
3 Entretanto, esta porcentagem varia dependendo do tipo celular e da taxa de
4 respiração (BACHI *et al.*, 2013; KLOTZ; SIES, 2009).

5 A reatividade do superóxido é muito menor que a do radical hidroxil. Ainda
6 possui baixa interação com algumas moléculas biológicas em soluções aquosas. O
7 radical não reage tão rapidamente quanto outros, contudo pode diminuir a atividade
8 de antioxidantes, como a catalase, além de reagir com outras moléculas, como o óxido
9 nítrico. Proteínas que contêm o seu centro ativo de ferro-enxofre (ex: aconitase) ou
10 substâncias que contêm radical fenil, como por exemplo o hidrogênio do grupamento
11 -OH da tirosina podem se tornar espécies reativas pela ação do ânion superóxido
12 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

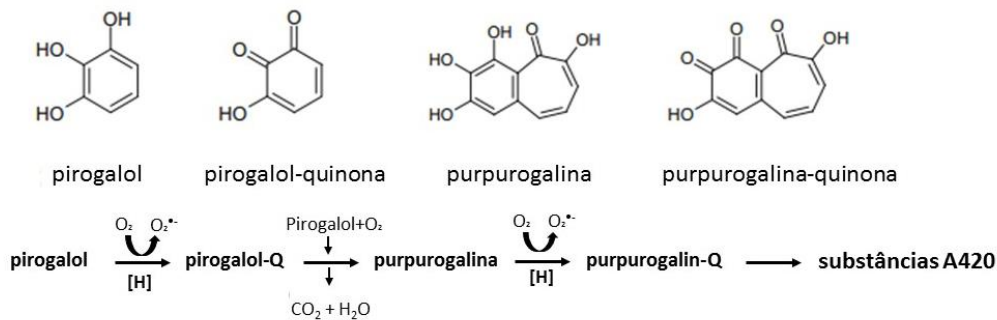
13 Existem diferentes métodos de geração de superóxido exógeno para avaliar
14 seus efeitos em sistemas biológicos: a) sistemas enzimáticos como xantina/xantina
15 oxidase; b) sistemas físicos como a radiólise, gerada por radiação ionizante; c)
16 sistemas químicos que sofrem auto-oxidação como superóxido de potássio (KO₂), o
17 superóxido de tetrametilamônio (Me₄N)O₂, adrenalina e o pirogalol (HALLIWELL;
18 GUTTERIDGE, 2007). A geração *in vitro* de superóxido pela auto-oxidação do
19 pirogalol é uma metodologia clássica, sendo extensivamente utilizada para avaliar o
20 efeito do ânion em diferentes condições, inclusive em cultura de células (KIM *et al.*,
21 1995; KIM *et al.*, 2008 KOSMIDOU *et al.*, 2002; MORENO-MANZANO *et al.*, 2000;
22 PARK *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 2003). O pirogalol (1,3,5-triidroxibenzeno) é
23 conhecido por sofrer auto-oxidação rapidamente, principalmente em meio alcalino
24 (MARKLUND; MARKLUND, 1974). A auto-oxidação do pirogalol é iniciada a partir de
25 sua reação com o oxigênio no estado fundamental, o que leva à produção de um
26 radical semiquinona (Figura 2) (KIM *et al.*, 1995). O produto final da auto-oxidação do
27 pirogalol é a purpurogalina (quantificada a 420nm), mas a reação gera outros
28 produtos, como o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Figura 3) (MARKLUND;
29 MARKLUND, 1974; RAMASARMA *et al.*, 2015). Apesar da auto-oxidação gerar outros
30 produtos, a principal ER formada é o ânion superóxido, pois com o uso da SOD a
31 auto-oxidação do pirogalol pode ser inibida em 97,5% (MARKLUND; MARKLUND,
32 1974).



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

Figura 2: Primeiras etapas da auto-oxidação do pirogallol.
Fonte: KIM *et al.* (1995)

A SOD é capaz de inibir a reação do pirogallol, sendo a principal defesa intracelular contra essa ER (MARKLUND; MARKLUND, 1974). Em mamíferos, existem três isoformas de SOD: SOD1 (CuZnSOD); SOD2(MnSOD); SOD3 (ecSOD). Cada uma é produto de genes distintos e possui localização subcelular diferente, apesar de as três catalisarem a mesma reação. A localização subcelular destas isoformas da enzima é particularmente importante para a sinalização redox: a SOD1 está na sua maioria no citosol e pode ser encontrada também na mitocôndria, no núcleo, peroxissomos e lisossomos; a SOD2 é mitocondrial; a SOD3 é encontrada em meio extracelular. O mecanismo de dismutação pela SOD envolve a redução do superóxido e oxidação de um metal de transição, tal como o Cu⁺ e Mn²⁺ no local ativo da enzima. Este fato indica que a atividade SOD requer um metal catalítico (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011).



17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

Auto-oxidação do pirogallol.
Fonte: Adaptado de RAMASARMA *et al.* (2015)

Figura 3:

Além da SOD, outras substâncias exógenas podem remover o superóxido, como o Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametillpiperidina-1-oxil), um composto que mimetiza a atividade da SOD, possuindo também como produto o peróxido de hidrogênio (WEINTRAUB *et al.*, 2015), ou o Tiron (4,5-dihidroxi-1,3-benzenodissulfônico ácido) que consegue sequestrar o superóxido sem gerar outras ER, oxidando a própria molécula e formando dímeros (TAIWO, 2008).

Apesar do sistema enzimático de remoção do superóxido em níveis basais ser eficiente, uma parte pode escapar das defesas. Assim, o superóxido excedente reage

1 com biomoléculas ou outras substâncias presentes no meio intracelular, como o óxido
2 nítrico ou metais de transição como ferro e enxofre de proteínas que contém esses
3 elementos em seus centros ativos (HURD; MURPHY, 2009).

4 Um nível elevado de superóxido em fibras musculares em condições
5 patológicas pode levar a um aumento do EO (JACKSON *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2010),
6 o que causaria lesão de membranas de organelas, danos a proteínas e DNA; fato que
7 estaria intrinsecamente relacionado ao processo de adaptação para sobrevivência
8 celular (HURD; MURPHY, 2009). Além disso, devido ao seu elevado perfil energético
9 fibras musculares esqueléticas são propensas a danos por espécies reativas de
10 oxigênio endógenas, causando alterações na função muscular (XU *et al.*, 2010).

11 1.2 MÚSCULO ESQUELÉTICO

12 1.2.1 Estrutura do Músculo Esquelético

13
14 A arquitetura do músculo esquelético é caracterizada por um arranjo muito
15 particular e bem descrito de fibras musculares associadas ao tecido conjuntivo. Um
16 músculo individual é rodeado por uma camada de tecido conjuntivo conhecido como
17 o epimísio. Um grupo de fibras dentro do músculo que estão dispostas em feixes são
18 rodeadas por outra camada de tecido conjuntivo conhecido como o perimísio. Uma
19 única fibra muscular (com as dimensões aproximadas de 100 µm de diâmetro e 1 cm
20 de comprimento) é rodeada por uma membrana celular ou sarcolema e dentro possui
21 uma grande quantidade de miofibrilas (Figura 4) (FRONTERA; OCHALA, 2015). As
22 miofibrilas (miofilamentos) são compostas em um arranjo ordenado de sarcômeros,
23 que são as unidades básicas contráteis de músculo esquelético. Os miofilamentos são
24 as estruturas mais abundantes, compostos por actina e miosina, que então
25 compreendem cerca de 70-80% do teor total de proteína de uma única fibra. A miosina
26 forma os filamentos grossos e a actina, os finos (FRONTERA; OCHALA, 2015).

27 Associado ao sarcolema existe um complexo de várias proteínas que está
28 fisicamente conectado à estrutura interna dos miofilamentos. A ausência (parcial ou
29 completa) ou disfunção de uma destas proteínas pode resultar em danos para o
30 sarcolema, fraqueza muscular e atrofia. Não considerando a água, em uma célula
31 muscular 80% da sua composição é de proteínas, os quais podem ser contrátil,
32 regulatória ou citoesqueleto (FRONTERA; OCHALA, 2015).

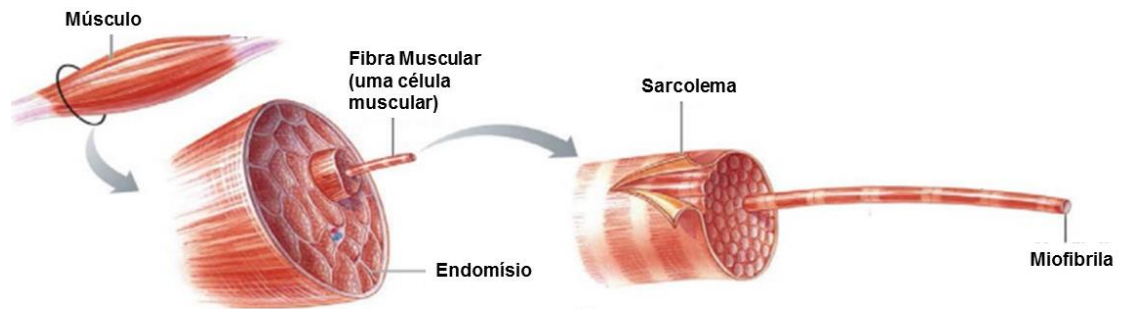


Figura 4: Estrutura do músculo esquelético.

Fonte: Adaptado de FRONTERA E OCHALA (2015)

As fibras musculares são células multinucleadas e pós-mitóticas. Ainda no tecido muscular, existem as células satélites que são as células-tronco adultas de músculo esquelético. Estas células estão localizadas entre o sarcolema e a lâmina basal e contribuem para o crescimento muscular, reparação e regeneração. Quando ativadas por fatores miogênicos, células satélites irão proliferar e diferenciar-se em novas fibras musculares (FRONTERA; OCHALA, 2015).

Como mencionado anteriormente, devido à sua alta demanda energética, o músculo esquelético é particular e altamente sensível às ER. No exercício físico, os níveis de ERO podem aumentar em um intervalo curto de tempo, favorecendo a adaptação (MASON; WADLEY, 2014; POWERS *et al.*, 2010). Em contraste com esse efeito benéfico das ER no músculo, produção crônica e em excesso de ERO sistemicamente e no músculo esquelético promove EO e pode contribuir para a patogênese de várias doenças como diabetes tipo 2 (HOHN *et al.*, 2013), caquexia no câncer (GUARNIER *et al.*, 2010), DPOC (PUIG-VILANOVA *et al.*, 2015), tireotoxicose (BERNARDES *et al.*, 2014), atrofia no desuso (POWERS *et al.*, 2010) e distrofias musculares (TERRILL *et al.*, 2013).

1.2.2 Espécies reativas no músculo estriado esquelético

Tanto o aumento da atividade contrátil do músculo como prolongados períodos de desuso muscular podem promover o aumento da produção de superóxido nas fibras musculares esqueléticas (POWERS *et al.*, 2010). As principais fontes de superóxido são: (a) mitocôndrias, que são citadas como a fonte predominante de ERO nas fibras musculares, particularmente o complexo I e III; (b) retículo sarcoplasmático (RS), principalmente pela NADPH oxidase, que a partir do momento de sua geração

1 afeta a liberação de cálcio do RS por meio de oxidação do receptor de rianodina; (c)
2 túbulos transversais, que assim como RS contém a NADPH oxidase cuja atividade é
3 aumentada pela despolarização; (d) sarcolema, onde as células de músculo
4 esquelético podem liberar superóxido para o espaço extracelular também pela
5 NADPH oxidase; e (e) no citoplasma pela enzima XO (POWERS *et al.*, 2010;
6 POWERS; JI, *et al.*, 2011).

7 Dada a importância de manter a homeostase redox nas células com alta
8 capacidade de adaptação, as fibras musculares possuem diversos mecanismos de
9 defesa antioxidantes. Algumas enzimas antioxidantes particularmente importantes
10 para o controle da geração da qualidade e quantidade de radicais livres no músculo
11 estriado esquelético são a SOD, a glutathione peroxidase e a catalase. No entanto,
12 apesar de seu papel constante na remoção específica de algumas espécies, essas
13 enzimas estão presentes em modestas concentrações no músculo já formado
14 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Contudo, o músculo conta ainda com outras
15 enzimas, como a peroxirredoxina, as glutarredoxinas e a tioredoxina. Além disso,
16 várias moléculas de baixo peso molecular são capazes de remover ERO nas células
17 musculares. Exemplos desta estratégia antioxidante incluem substâncias sintetizadas
18 endogenamente, tais como a glutathione reduzida (GSH), o ácido úrico e bilirrubina, e
19 outros compostos presentes na dieta como o ácido ascórbico e a vitamina E
20 (POWERS *et al.*, 2010; POWERS; JI, *et al.*, 2011).

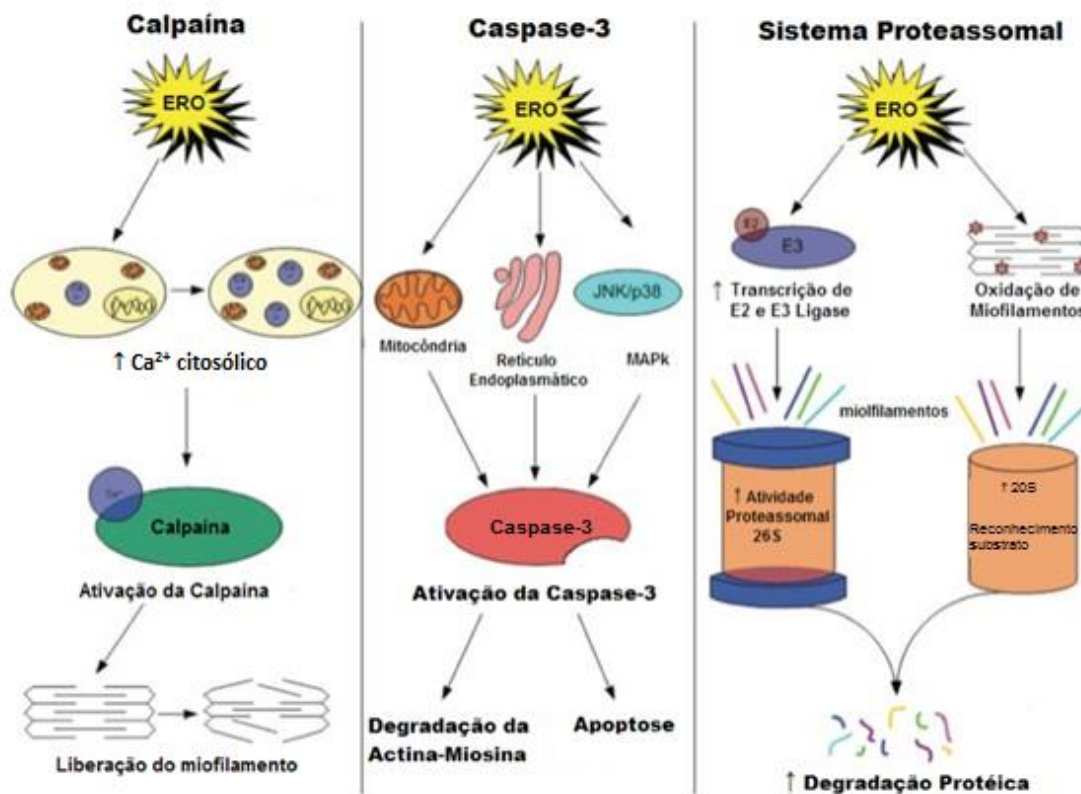
21 Como informado, as ERO desempenham um papel importante na regulação
22 das vias de sinalização celulares necessárias para promover a adaptação do músculo
23 esquelético em resposta a diferentes demandas metabólicas, como o exercício físico
24 e a inatividade muscular (JACKSON, 2008; MASON; WADLEY, 2014; POWERS *et al.*,
25 2010). Enquanto altas concentrações de radicais livres podem lesar componentes
26 celulares, níveis baixos a moderados podem desempenhar múltiplas funções
27 regulatórias em vias de sinalização celular, como o controle da expressão gênica e
28 modulação da função do músculo esquelético. Este paradoxo na sinalização deve-se
29 provavelmente às diferenças tanto na magnitude, quanto no tipo de espécie gerada
30 ou ao padrão temporal da produção de radicais livres (POWERS *et al.*, 2010;
31 POWERS; TALBERT, *et al.*, 2011).

32 Um dos efeitos importantes das ER no músculo esquelético está relacionado
33 com a perda de massa muscular, que pode acontecer no desuso e em algumas
34 doenças. A perda de massa, ou em alguns casos a atrofia muscular, vem sendo

1 relacionada ao aumento na quantidade de proteínas oxidadas, o que ativaria
2 diferentes vias de degradação (POWERS *et al.*, 2010). Já foi descrito que EO pode
3 levar à uma ativação direta destas vias. Onde as ER podem levar ao desequilíbrio no
4 metabolismo do cálcio, levando ao aumento do cálcio citosólico, o que causaria
5 ativação do zimógeno calpaína, que por sua vez cliva as proteínas que ancoram o
6 complexo actina-miosina, liberando os componentes proteicos do sarcômero para a
7 degradação pelo sistema proteassomal; a ativação de caspase-3 por meio do mesmo
8 aumento na concentração de cálcio citosólico promove a degradação diretamente da
9 actomiosina, e leva à morte de mionúcleos; no que diz respeito diretamente ao sistema
10 proteassomal, ERO podem sinalizar aumento da síntese de enzimas relacionadas
11 com a ubiquitinação (proteínas do tipo E2 e E3), ou ainda o 20S pode degradar
12 proteínas oxidadas sem ubiquitinação (Figura 5) (POWERS *et al.*, 2010; TALBERT *et*
13 *al.*, 2013).

14 Embora muitos mecanismos redox já estejam definidos, estudos sistemáticos
15 e bem controlados são necessários para esclarecer melhor como as ER atuam na
16 sinalização redox na adaptação muscular. O equilíbrio entre a atrofia e hipertrofia é
17 importante para a manutenção da massa muscular esquelética. A proteólise e a
18 modificações redox mostram-se cada vez mais envolvidas com os processos de
19 atrofia (POWERS *et al.*, 2010). No entanto, como o músculo esquelético é incapaz de
20 se dividir, uma compreensão dos mecanismos que permitem a plasticidade é
21 fundamental para o entendimento do funcionamento dessa célula frente a diferentes
22 circunstâncias que induzem EO (SHARPLES *et al.*, 2010).

23 As células-tronco musculares (células satélites ou mioblastos) parecem ter um
24 papel central no aumento ou diminuição da massa muscular esquelética, portanto, têm
25 atraído o interesse no que diz respeito ao potencial de intervenções terapêuticas.
26 Dentro desse contexto, as linhagens celulares de músculo esquelético murinas C2 e
27 C2C12 têm sido frequentemente utilizados para fins de investigação (SHARPLES *et*
28 *al.*, 2010).



1

2 **Figura 5. Efeito das de vias proteolíticas e ativação pelas espécies reativas de oxigênio no**3 **músculo esquelético.**4 **Fonte:** Adaptado de POWERS *et al.* (2010)

5

6 **1.2.3 Cultura de célula C2C12**

7

8 Culturas de mioblastos são importantes ferramentas para estudar mecanismo

9 moleculares das vias de sinalização potencialmente utilizadas pelo músculo

10 esquelético *in vivo* para regular a hipertrofia e atrofia (SHARPLES; STEWART, 2011).

11 Os mioblastos apresentam-se como um modelo vantajoso por proporcionar a

12 avaliação de alterações bioquímicas e moleculares (BLAU *et al.*, 1983), uma vez que

13 é possível controlar as condições de geração de diferentes estímulos. Com relação às

14 espécies reativas, é possível controlar as condições dos radicais, avaliar efeitos de

15 radicais específicos, sua concentração, tempo de exposição, temperatura e pH.

16 A linhagem C2C12 é um subclone produzido por Blau *et al.* (1983), a partir da

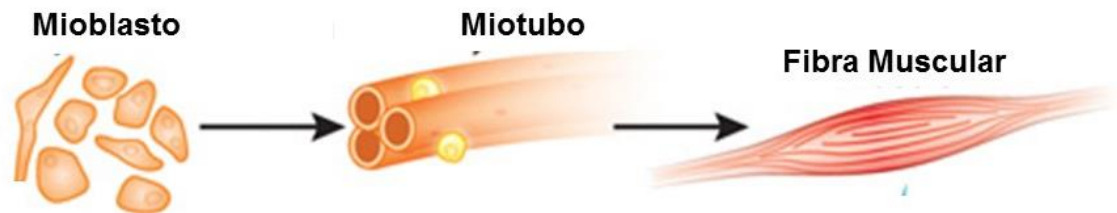
17 linhagem original C2 isolada por Yaffe e Saxel (1977) a partir de uma lesão por

18 esmagamento do músculo de camundongo C3H, para induzir a proliferação de células

19 satélites. As células C2C12 são mantidas como mioblastos indiferenciados, mas

podem ser diferenciadas para formar miotubos (BLAU *et al.*, 1983).

1 A miogênese do músculo esquelético de mamíferos é complexa, e tem lugar a
 2 partir das primeiras semanas de desenvolvimento embrionário (Figura 6). As células
 3 de mesoderma pluripotentes fornecem uma população de células fusiformes
 4 mononucleadas, os mioblastos, conhecidos por serem os precursores das células de
 5 músculo contráteis (BURATTINI *et al.*, 2004). Mioblastos mononucleados se fundem
 6 para formar miotubos multinucleados, que se tornam visivelmente estriados e
 7 ritmicamente contráteis em cultura de tecido (BLAU *et al.*, 1983). Embora a miosina
 8 seja um dos principais componentes do aparelho contrátil em músculos já formados,
 9 a sua presença em células indiferenciadas é bem documentada.



10

11 **Figura 6. Formação da fibra muscular.**12 **Fonte:** Adaptado de Hettmer e Wagers (2010)

13

14 O mioblasto apresenta um tamanho de 20-80 μm , possui formato de estrela ou
 15 fusiforme, rigorosamente mostrando um núcleo central com vários nucléolos. A actina
 16 e miosina já são expressas nessa fase, enquanto a actina é amplamente expressa no
 17 citoplasma, a miosina é concentrada ao redor do núcleo. Entretanto, o miotubo possui
 18 100-600 μm de comprimento e 30-50 μm de espessura, seu formato é fusiforme,
 19 frequentemente alongado em três ou quatro direções. Eles mostram numerosos
 20 núcleos (mais de 20), localizados centralmente e aglutinados ou distribuídos ao longo
 21 de toda sua extensão. Apresenta uma grande quantidade de actina e miosina
 22 (também na região perinuclear), são encontrados filamentos finos e grossos, ambos
 23 organizados para formar sarcômero e miofibrilas. Secções transversais mostram as
 24 relações entre os filamentos grossos e finos, que aparecem estreitamente
 25 comparáveis com os do músculo esquelético adulto (BURATTINI *et al.*, 2004). Nos
 26 miotubos a quantidade de mitocôndrias é muito maior do que no mioblasto e a sua
 27 distribuição é alinhada ao longo da célula enquanto no mioblasto sua localização é
 28 perinuclear (BARBIERI *et al.*, 2011). A análise proteômica também mostra uma grande
 29 diferença entre as duas células (KISLINGER *et al.*, 2005; TOMCZAK *et al.*, 2004;). A
 30 MnSOD tem uma expressão maior nos miotubos (BARBIERI *et al.*, 2011; KISLINGER
 31 *et al.*, 2005; TOMCZAK *et al.*, 2004), existindo também uma diferença entre a atividade

1 e expressão de algumas proteínas envolvidas com as vias de degradação proteicas
2 (BECHET *et al.*, 1991; EBISUI *et al.*, 1995).

3 Alguns estudos têm utilizado a linhagem C2C12 para avaliar os efeitos das ER
4 nas mudanças oxidativas e vias proteolíticas. Gomes-Marcondes e Tisdale (2002)
5 utilizando o peróxido de hidrogênio, por 30 min, mostraram que esta ER na
6 concentração de 100 µM aumenta a atividade do proteassoma e o nível da enzima
7 conjugadora de ubiquitina (E2). Li e colaboradores (2003), também utilizando o
8 peróxido de hidrogênio sob exposição contínua na mesma concentração (100 µM),
9 encontraram níveis aumentados da atividade de conjugação da ubiquitina, tanto com
10 relação à enzima E2 como com E3 (ubiquitina proteína ligase). O H₂O₂ ainda foi capaz
11 de diminuir a GSH e levar à ativação do NF-κB (ARDITE *et al.*, 2004). Ainda utilizando
12 o H₂O₂ (25 µM) sob exposição contínua, McClung e colaboradores (2008) viram que
13 a atrofia no miotubo estava relacionada com o aumento da atividade da calpaína.
14 Morabito e colaboradores (2009) avaliaram o efeito de campos eletromagnéticos de
15 frequência extremamente baixa e investigaram diversos parâmetros redox na célula,
16 encontrando uma quantidade maior de superóxido e peróxido de hidrogênio, uma
17 capacidade antioxidante total aumentada, maior atividade das enzimas catalase e
18 glutathione peroxidase, além de um desbalanço no cálcio intracelular. O peróxido de
19 hidrogênio também foi capaz de ativar vias de sinalização e levar a apoptose em
20 miotubos (RABINOVICH *et al.*, 2007), causar fragmentação mitocondrial (FAN *et al.*,
21 2010), ou levar à polimerização da actina comprometendo o citoesqueleto da célula
22 (WONG *et al.*, 2015).

23 A maior dificuldade na extrapolação destes resultados obtidos *in vitro* para *in*
24 *vivo* reside no fato de que a maior parte dos estudos utiliza basicamente o peróxido
25 de hidrogênio como ER. Além disso, não existem muitos estudos *in vitro* sobre a
26 geração específica de outros radicais livres e seus efeitos na indução da lesão celular
27 e proteólise, como por exemplo o ânion superóxido. Outra questão importante a ser
28 considerada em trabalhos que utilizam cultura de células e que investigam a ação do
29 peróxido de hidrogênio é que um dos componentes do meio de cultura, o sódio
30 piruvato, possui capacidade de sequestrar o peróxido de hidrogênio, afetando os
31 efeitos da ER estudada (KELTS *et al.*, 2015; LONG; HALLIWELL, 2009). Por esta
32 razão, neste trabalho foram investigados os efeitos de um gerador de ânion
33 superóxido, o pirogalol, sobre parâmetros de estresse oxidativo e vias proteolíticas em
34 cultura de mioblastos e miotubos C2C12.

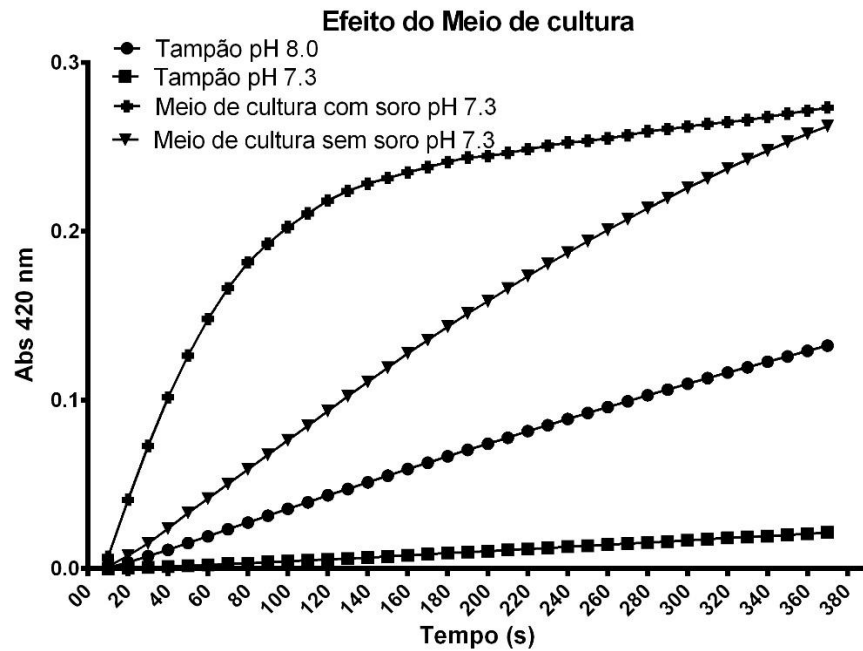
1

2 1.2.4 Resultados preliminares do delineamento

3 Considerando possíveis interferências no sistema gerador em meio de cultura,
4 nós avaliamos a interferência da composição do meio de cultura sobre a geração de
5 produtos da auto-oxidação do pirogalol (purporogalina). Foram avaliadas a presença
6 ou ausência do meio de cultura (Meio Eagle Modificado por Dulbecco-DMEM), a
7 presença ou ausência de soro (soro fetal bovino – 10%), e a geração dos produtos
8 frente a diferentes pH. O soro fetal bovino contém grande quantidade de albumina,
9 um potente scavenger de radicais livres, e variações de pH também são importantes
10 para a formação de radicais por reações de óxido-redução. A absorbância foi
11 registrada em espectrofotômetro a 420 nm (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

12 A auto-oxidação do pirogalol (Figura 7) mostrou-se sensivelmente diminuída
13 em tampão (Tris-HCL) em pH 7,3. Quando realizada em meio de cultura, esse efeito
14 não acontece, mesmo o pH do meio de cultura sendo 7,3. Apesar da auto-oxidação
15 acontecer nas duas situações, a curva com a presença de soro apresenta um
16 crescimento exponencial da geração de produtos finais, ou seja, tem aumento da
17 velocidade de formação de superóxido nos primeiros segundos avaliados, com
18 alcance precoce na formação de um platô. A curva sem soro mostra um crescimento
19 linear e contínuo. Pelo exposto, optou-se por utilizar como veículo de tratamento das
20 células ao longo dos experimentos, assim como durante as padronizações, o meio
21 DMEM sem soro, pois a geração de superóxido é contínua, no tempo. Após verificar
22 se o superóxido seria produzido em meio de cultura, foi avaliada a geração do ânion
23 em diferentes concentrações de pirogalol, e se a geração teria um efeito dose-
24 dependente (Figura 8).

25 Observou-se então que as diferentes concentrações de pirogalol resultaram em
26 curvas de geração do superóxido que respondem de maneira dose-dependente.
27 Desta forma, pôde-se concluir que as células seriam submetidas a concentrações
28 crescentes de superóxido durante os tratamentos.

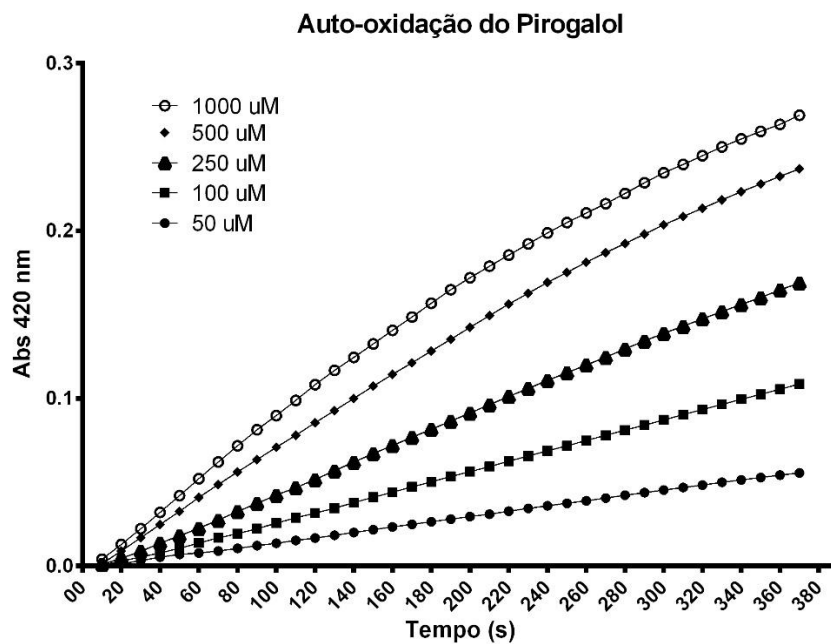


1

2 **Figura 7 – Curva da auto-oxidação do pirogalol em tampão e em meio de cultura, presença ou**
 3 **ausência de soro fetal bovino. Absorbância - 420 nm.**

4 **Fonte:** Elaborado pelo autor

5



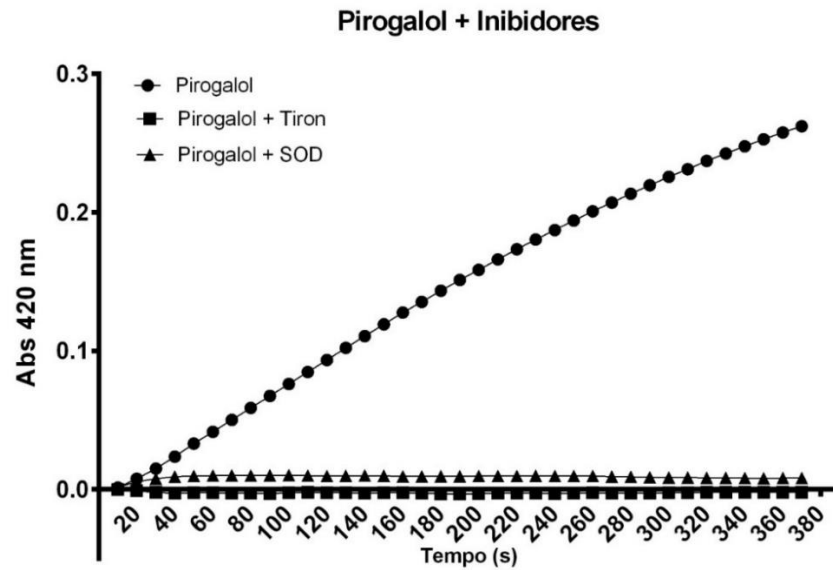
6

7 **Figura 8 – Curva da auto-oxidação do pirogalol em diferentes concentrações finais (50, 100, 250,**
 8 **500 e 1000 uM). Absorbância - 420 nm.**

9 **Fonte:** Elaborado pelo autor

10

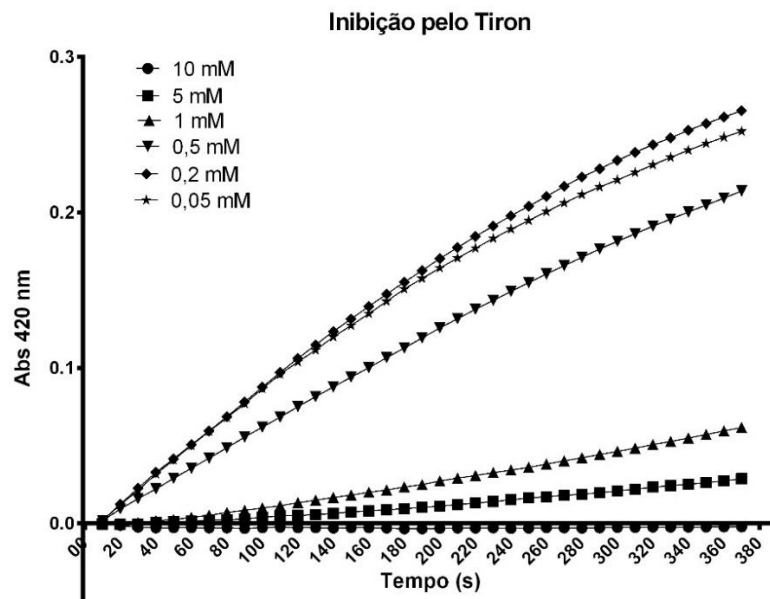
11 A próxima análise foi verificar a especificidade da geração de superóxido frente
 12 à exposição a diferentes inibidores. Para isso, foram utilizados o sequestrador de
 13 superóxido Tiron e a enzima superóxido dismutase (Figura 9).



1
2 **Figura 9– Auto-oxidação do pirogalol na presença dos antioxidantes Tiron (10mM) e superóxido**
3 **dismutase (SOD-20000 ng/mL). Absorbância - 420 nm.**

4 **Fonte:** Elaborado pelo autor

5
6 Os dois inibidores foram capazes de impedir a auto-oxidação do pirogalol. A
7 enzima SOD foi utilizada porque sua capacidade de dismutar o ânion superóxido é
8 bem descrita. Entretanto, a utilização da SOD levaria à produção de peróxido de
9 hidrogênio e dificultaria a análise dos efeitos exclusivos do ânion superóxido. Desta
10 forma, optou-se por utilizar o composto Tiron, um sequestrador do ânion superóxido.
11 A próxima etapa da padronização foi verificar o efeito do Tiron em diferentes
12 concentrações na geração de superóxido (Figura 10).



13
14 **Figura 10– Inibição da auto-oxidação do pirogalol na presença de Tiron em diferentes**
15 **concentrações (0,05; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 e 10mM). Absorbância - 420 nm.**

16 **Fonte:** Elaborado pelo autor

1 Os resultados demonstraram que assim como o pirogalol, o efeito do Tiron foi
2 dose-dependente. A partir da concentração de 5mM não foi possível observar a auto-
3 oxidação do pirogalol.

4 Tendo em vista o exposto e levando em consideração que as ER são
5 constantemente geradas no interior das células e que EO é capaz de induzir
6 modificação de proteínas intracelulares e sinalização a favor da proteólise, a
7 compreensão da participação de diferentes ER nesse processo é muito importante
8 para elucidar os mecanismos de proteólise encontrados em diferentes condições
9 fisiológicas e patológicas. Além disso, considerando que a maior parte dos estudos
10 nesse sentido utilizam peróxido de hidrogênio como ER, e sabendo-se que as
11 diferentes espécies podem ter efeitos distintos em moléculas e vias de sinalização,
12 este trabalho justifica-se por utilizar um sistema gerador de ânion superóxido em
13 diferentes concentrações para analisar parâmetros de consequências do aumento do
14 estresse oxidativo e consequente indução de vias proteolíticas em cultura de C2C12.
15 O trabalho traz ainda como inovação a comparação do efeito do superóxido sobre
16 células C2C12 diferenciadas ou não, avaliando o comportamento da mesma célula,
17 em dois diferentes graus de diferenciação, frente ao mesmo estímulo.

1 2 HIPÓTESES

2

3 Diferentes concentrações de ânion superóxido levam a alterações oxidativas
4 que resultam na ativação de vias proteolíticas. Mioblastos e miotubos possuem
5 respostas diferentes ao mesmo estímulo.

1 3 OBJETIVOS

2

3 3.1 OBJETIVO GERAL

4

5 Verificar o efeito de moderadas concentrações do ânion superóxido sobre
6 parâmetros de citotoxicidade, estresse oxidativo e vias proteolíticas em cultura de
7 mioblastos e miotubos C2C12.

8

9 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

10

11 Avaliar os efeitos na atividade metabólica em mioblasto e miotubo em
12 diferentes concentrações do ânion superóxido;

13 Avaliar danos oxidativos à membranas e proteínas frente à geração de
14 diferentes concentrações do ânion superóxido;

15 Correlacionar os danos oxidativos e alteração do balanço redox com a
16 degradação proteica frente a diferentes concentrações do ânion superóxido

1 **4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**
2

3 O presente trabalho originou um artigo científico que será incluído nessa
4 dissertação como apêndice.

5 O artigo intitula-se: SUPEROXIDE INDUCES DIFFERENT METABOLIC AND
6 OXIDATIVE MODIFICATIONS IN C2C12 MYOBLASTS AND C2C12 MYOTUBES
7

1 **5 CONCLUSÕES**

2
3 O conjunto de resultados alcançados nos permitiu chegar as seguintes
4 conclusões sobre os efeitos iniciais de uma espécie reativa específica no início do
5 processo de adaptação, em dois diferentes estágios de diferenciação, utilizando
6 concentrações não letais por um curto período. Os efeitos ainda não foram capazes
7 de produzir um aumento da atividade proteolítica. Parece que a diminuição da
8 atividade metabólica de organelas representa os primeiros acontecimentos em
9 mioblastos e miotubos. No entanto, a peroxidação lipídica parece ser um
10 acontecimento crítico nos mioblastos, enquanto que a oxidação da proteína parece
11 ser o evento chave nos miotubos.

REFERÊNCIAS

- 1
2
- 3 AFANAS'EV, I. B. On mechanism of superoxide signaling under physiological and
4 pathophysiological conditions. **Med Hypotheses**, v. 64, n. 1, p. 127-9, 2005
- 5 ALAMDARI, D. H. et al. High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay
6 (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of
7 protein. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 10, p. 1362-7, 2005.
- 8 ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radic Biol**
9 **Med**, v. 28, n. 3, p. 463-99, 2000.
- 10 APPELQVIST, H. et al. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic
11 target. **J Mol Cell Biol**, v. 5, n. 4, p. 214-26, 2013.
- 12 ARDITE, E. et al. Glutathione depletion impairs myogenic differentiation of murine
13 skeletal muscle C2C12 cells through sustained NF-kappaB activation. **Am J Pathol**,
14 v. 165, n. 3, p. 719-28, 2004.
- 15 AYALA, A. et al. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling
16 Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine**
17 **and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 31, 2014.
- 18 BACHI, A.; DALLE-DONNE, I.; SCALONI, A. Redox proteomics: chemical principles,
19 methodological approaches and biological/biomedical promises. **Chem Rev**, v. 113,
20 n. 1, p. 596-698, 2013.
- 21 BARBIERI, E. et al. Morphofunctional and Biochemical Approaches for Studying
22 Mitochondrial Changes during Myoblasts Differentiation. **J Aging Res**, v. 2011, p.
23 845379, 2011.
- 24 BARBOUR, J. A.; TURNER, N. Mitochondrial stress signaling promotes cellular
25 adaptations. **Int J Cell Biol**, v. 2014, p. 156020, 2014.
- 26 BARREIRO, E.; HUSSAIN, S. N. Protein carbonylation in skeletal muscles: impact on
27 function. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 3, p. 417-29, 2010.
- 28 BECHET, D. M. et al. Expression of lysosomal cathepsin B during calf myoblast-
29 myotube differentiation. Characterization of a cDNA encoding bovine cathepsin B. **J**
30 **Biol Chem**, v. 266, n. 21, p. 14104-12, 1991.
- 31 BERNARDES, S. S. et al. Reactive oxygen species play a role in muscle wasting
32 during thyrotoxicosis. **Cell Tissue Res**, v. 357, n. 3, p. 803-14, 2014.
- 33 BLAU, H. M.; CHIU, C. P.; WEBSTER, C. Cytoplasmic activation of human nuclear
34 genes in stable heterocaryons. **Cell**, v. 32, n. 4, p. 1171-80, 1983.
- 35 BRUNNQUELL, C. R. et al. Oxidative and proteolysis-related parameters of skeletal
36 muscle from hamsters with experimental pulmonary emphysema: a comparison
37 between papain and elastase induction. **Int J Exp Pathol**, 2015.

- 1 BURATTINI, S. et al. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle
2 development: morpho-functional characterization. **Eur J Histochem**, v. 48, n. 3, p.
3 223-33, 2004.
- 4 BUTTERFIELD, D. A.; DALLE-DONNE, I. Redox proteomics: from protein
5 modifications to cellular dysfunction and disease. **Mass Spectrom Rev**, v. 33, n. 1,
6 p. 1-6, 2014.
- 7 DAIBER, A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves
8 mitochondrial pores and reactive oxygen species. **Biochim Biophys Acta**, v. 1797,
9 n. 6-7, p. 897-906, 2010.
- 10 DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease
11 progression. **J Cell Mol Med**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.
- 12 DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. **Trends Mol Med**,
13 v. 9, n. 4, p. 169-76, 2003.
- 14 EBISUI, C. et al. Changes of proteasomes and cathepsins activities and their
15 expression during differentiation of C2C12 myoblasts. **J Biochem**, v. 117, n. 5, p.
16 1088-94, 1995.
- 17 FAN, X.; HUSSIEN, R.; BROOKS, G. A. H₂O₂-induced mitochondrial fragmentation
18 in C2C12 myocytes. **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 11, p. 1646-54, 2010.
- 19 FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and
20 function. **Calcif Tissue Int**, v. 96, n. 3, p. 183-95, 2015.
- 21 FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling,
22 vascular function, and diseases. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 6, p. 1583-606,
23 2011.
- 24 GIUSTARINI, D. et al. Protein thiolation index (PTI) as a biomarker of oxidative
25 stress. **Free Radic Biol Med**, v. 53, n. 4, p. 907-15, Aug 15 2012.
- 26 GUARNIER, F. A. et al. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in
27 rats with Walker 256 solid tumor. **Muscle Nerve**, v. 42, n. 6, p. 950-8, Dec 2010.
- 28 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed.
29 Oxford University Press, 2007.
- 30 HETTMER, S.; WAGERS, A. J. Muscling in: Uncovering the origins of
31 rhabdomyosarcoma. **Nat Med**, v. 16, n. 2, p. 171-173, 2010
- 32 HOHN, A.; KONIG, J.; GRUNE, T. Protein oxidation in aging and the removal of
33 oxidized proteins. **J Proteomics**, v. 92, p. 132-59, 2013.
- 34 HURD, T. R.; MURPHY, M. P. Biological Systems Relevant for Redox Signaling and
35 Control. In: (Ed.). **Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine**:
36 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p.13-43, 2009.
- 37 JACKSON, M. J. Redox regulation of skeletal muscle. **IUBMB Life**, v. 60, n. 8, p.
38 497-501, 2008.

- 1 JACKSON, M. J.; PYE, D.; PALOMERO, J. The production of reactive oxygen and
2 nitrogen species by skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 102, n. 4, p. 1664-70,
3 2007.
- 4 KELTS, J. L. et al. Altered cytotoxicity of ROS-inducing compounds by sodium
5 pyruvate in cell culture medium depends on the location of ROS generation.
6 **Springerplus**, v. 4, p. 269, 2015.
- 7 KIM, S. J. et al. Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural
8 antioxidants. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 59, n. 5, p. 822-6, 1995.
- 9 KIM, S. W. et al. A superoxide anion generator, pyrogallol, inhibits the growth of
10 HeLa cells via cell cycle arrest and apoptosis. **Mol Carcinog**, v. 47, n. 2, p. 114-25,
11 2008.
- 12 KISLINGER, T. et al. Proteome dynamics during C2C12 myoblast differentiation.
13 **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 7, p. 887-901, 2005.
- 14 KLOTZ, L.-O.; SIES, H. Cellular Generation of Oxidants: Relation to Oxidative Stress.
15 In: (Ed.). **Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine**: Wiley-VCH
16 Verlag GmbH & Co. KGaA, p.45-61, 2009.
- 17 KOSMIDOU, I. et al. Production of interleukin-6 by skeletal myotubes: role of
18 reactive oxygen species. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 26, n. 5, p. 587-93, 2002.
- 19 LONG, L. H.; HALLIWELL, B. Artefacts in cell culture: pyruvate as a scavenger of
20 hydrogen peroxide generated by ascorbate or epigallocatechin gallate in cell culture
21 media. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 388, n. 4, p. 700-4, 2009.
- 22 MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the
23 autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J**
24 **Biochem**, v. 47, n. 3, p. 469-74, 1974.
- 25 MASON, S.; WADLEY, G. D. Skeletal muscle reactive oxygen species: a target of
26 good cop/bad cop for exercise and disease. **Redox Rep**, v. 19, n. 3, p. 97-106, 2014.
- 27 MORENO-MANZANO, V. et al. Selective involvement of superoxide anion, but not
28 downstream compounds hydrogen peroxide and peroxynitrite, in tumor necrosis
29 factor-alpha-induced apoptosis of rat mesangial cells. **J Biol Chem**, v. 275, n. 17, p.
30 12684-91, 2000.
- 31 MURAKAMI, H. et al. Cumulative 3-nitrotyrosine in specific muscle proteins is
32 associated with muscle loss during aging. **Exp Gerontol**, v. 47, n. 2, p. 129-35, 2012.
- 33 PARK, W. H. et al. A superoxide anion generator, pyrogallol induces apoptosis in
34 As4.1 cells through the depletion of intracellular GSH content. **Mutat Res**, v. 619, n.
35 1-2, p. 81-92, 2007.
- 36 POWERS, S. K. et al. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal
37 muscle adaptation. **Exp Physiol**, v. 95, n. 1, p. 1-9, 2010.
- 38 POWERS, S. K. et al. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. **Compr**
39 **Physiol**, v. 1, n. 2, p. 941-69, 2011.

- 1 POWERS, S. K.; TALBERT, E. E.; ADHIHETTY, P. J. Reactive oxygen and nitrogen
2 species as intracellular signals in skeletal muscle. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 9, p. 2129-
3 38, 2011.
- 4 PUIG-VILANOVA, E. et al. Oxidative stress, redox signaling pathways, and
5 autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung
6 cancer. **Free Radic Biol Med**, v. 79, p. 91-108, 2015.
- 7 RABINOVICH, R. A. et al. Mitochondrial dysfunction in COPD patients with low body
8 mass index. **Eur Respir J**, v. 29, n. 4, p. 643-50, 2007.
- 9 RAMASARMA, T. et al. New insights of superoxide dismutase inhibition of pyrogallol
10 autoxidation. **Mol Cell Biochem**, v. 400, n. 1-2, p. 277-85, 2015.
- 11 RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis
12 and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal**, v. 24, n. 5, p. 981-90, 2012.
- 13 SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative
14 stress. **Curr Biol**, v. 24, n. 10, p. R453-62, 2014.
- 15 SHARPLES, A. P.; STEWART, C. E. Myoblast models of skeletal muscle
16 hypertrophy and atrophy. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 14, n. 3, p. 230-6,
17 Maio 2011.
- 18 SHARPLES, A. P.; AL-SHANTI, N.; STEWART, C. E. C2 and C2C12 murine skeletal
19 myoblast models of atrophic and hypertrophic potential: relevance to disease and
20 ageing? **J Cell Physiol**, v. 225, n. 1, p. 240-50, 2010.
- 21 TAIWO, F. A. Mechanism of tiron as scavenger of superoxide ions and free
22 electrons. **Spectroscopy**, v. 22, n. 6, 2008.
- 23 TALBERT, E. E. et al. Calpain and caspase-3 play required roles in immobilization-
24 induced limb muscle atrophy. **J Appl Physiol (1985)**, v. 114, n. 10, p. 1482-9, 2013.
- 25 TERRILL, J. R. et al. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus
26 on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. **FEBS J**, v. 280, n. 17, p. 4149-64,
27 2013.
- 28 TOMCZAK, K. K. et al. Expression profiling and identification of novel genes
29 involved in myogenic differentiation. **FASEB J**, v. 18, n. 2, p. 403-5, 2004.
- 30 WEINTRAUB, S. et al. SOD mimetic activity and antiproliferative properties of a
31 novel tetra nuclear copper (II) complex. **J Biol Inorg Chem**, v. 20, n. 8, p. 1287-98,
32 2015.
- 33 WONG, S. W. et al. H₂O₂ Exposure Affects Myotube Stiffness and Actin Filament
34 Polymerization. **Ann Biomed Eng**, v. 43, n. 5, p. 1178-88, 2015.
- 35 XU, X. et al. Analysis of superoxide production in single skeletal muscle fibers. **Anal**
36 **Chem**, v. 82, n. 11, p. 4570-6, 2010.

- 1 YAFFE, D.; SAXEL, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated
- 2 from dystrophic mouse muscle. **Nature**, v. 270, n. 5639, p. 725-7, 1977.
- 3 YAMADA, J. et al. Cell permeable ROS scavengers, Tiron and Tempol, rescue
- 4 PC12 cell death caused by pyrogallol or hypoxia/reoxygenation. **Neurosci Res**, v.
- 5 45, n. 1, p. 1-8, 2003.

1

APÉNDICE A

1 **SUPEROXIDE INDUCES DIFFERENT METABOLIC AND OXIDATIVE**
2 **MODIFICATIONS IN C2C12 MYOBLASTS AND C2C12 MYOTUBES**

3 Thamara N. X. Silva¹; Poliana C. Marinello²; Laís R. Sábio¹; Thâmara Alves²; Rodrigo

4 C. Luiz²; Rubens Cecchini³; Alessandra L. Cecchini²; Flávia A. Guarnier^{1*}

5
6 ¹ Laboratory of Pathophysiology of Muscle Adaptations, Department of General
7 Pathology, Universidade Estadual de Londrina, PR

8 ² Laboratory of Molecular Pathology, Department of General Pathology, Universidade
9 Estadual de Londrina, PR

10 ³ Laboratory of Pathophysiology and Free Radicals, Department of General
11 Pathology, Universidade Estadual de Londrina, PR

12
13 **Corresponding author:**

14 Flávia A. Guarnier

15 Laboratory of Pathophysiology of muscle adaptations

16 Department of Pathological Sciences

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

18 Campus Universitário

19 E-mail: faguarnier@uel.br

20 Phone/Fax +55-43-33714267

21 86051-990 Londrina, Brazil

1 **Abstract**

2 In both adult mice and human skeletal muscles, a mixture of mature (myotubes) and
3 satellite cells (myoblasts, 5-7%) can be found practically under the same metabolic
4 environment and challenge. The objective of the present study was to investigate the
5 different oxidative sensitivities of C2C12 myoblasts and C2C12 myotubes under the
6 generation of superoxide anion. Methods: C2C12 myoblasts and myotubes were
7 exposed to crescent pyrogallol concentrations (50 μ M, 100 μ M, 250 μ M and 500 μ M) for
8 30min at 37°C. In addition, both cell systems were also pre treated with Tiron 5mM, for
9 1h. Viability and metabolic/cytotoxic tests were carried out followed by quantification of
10 protein carbonylation, lipid peroxidation, and redox status assays. Proteolysis was also
11 assessed, by chemiluminescence. Results: No concentration was able to decrease the
12 viability in myoblasts or myotubes. In C2C12 myoblasts, neutral red activity was
13 decreased at concentrations of 250 and 500 μ M; 500 μ M of pyrogallol was able to
14 decrease the MTT activity and increase lipid peroxidation. In C2C12 myotubes, only
15 the concentration of 500 μ M decreased the activity of neutral red; carbonyl content
16 increased from 100 μ M. Both in myoblasts and myotubes, the results were reverted by
17 pre treatment with Tiron. Conclusions: lipid peroxidation is an early critical adaptative
18 event in myoblasts, whereas protein oxidation has this role on myotybes. No of these
19 events lead to significant proteolysis. General significance: the consequences of a
20 single radicalar specie, at low concentrations, on the very beginning of the adaptation
21 process, are different to the same population of cells on a different state of
22 differentiation.

23

24 **Key words:** Superoxide. C2C12. Oxidative stress. Skeletal muscle.

1 Introduction

2
3 The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the pathogenesis of
4 diseases is not limited to the macromolecular damage [1]. Many studies show that
5 ROS are important messengers on redox signaling pathways and that are also
6 involved in modulating several mechanisms [2-5]. Despite the known damage to lipid
7 membranes, what includes cell membranes and organelles [6,7], constitutive and
8 functional proteins are also easy targets of ROS. Both events are highly dependent of
9 the type of specie generated, amount of generation, and time of exposure [5,8-9].
10 These are the main factors that, in the end point, control the events that lead to
11 adaptation, severe injury, regeneration or cell death.

12 In aerobic cells, the most important source of ROS production is the anion
13 superoxide ($O_2^{\cdot-}$) produced by the mitochondria in the electron transport chain. It has
14 often been suggested that about 1-5% of the total O_2 reduced in mitochondria may
15 form $O_2^{\cdot-}$ [10]. Due to their high energetic profile, skeletal muscle fibers are prone to
16 damage by endogenous ROS [11]. Under stress conditions, as exercise, oxygen
17 consumption in the active skeletal muscle may go up 100-fold and the levels of
18 superoxide generation increase in the same proportion [10]. A high level of superoxide
19 in muscle fibers, under pathological conditions, is also frequently observed [11,12]. In
20 addition, reactive species are known to modulate skeletal muscle mass in a sort of
21 diseases [4,13-19]. The muscle wasting has been consistently related to an increase
22 on oxidation of myofibrillar proteins, that can activate proteolytic pathways. Yet, levels
23 of superoxide dismutase (SOD), the most efficient molecule on blocking $O_2^{\cdot-}$ reactivity,
24 are only modest in skeletal muscle when compared to other tissues [10].

25 The mentioned mechanisms are supposed to act on skeletal muscle tissue cells
26 across the board in all stages of development. However, skeletal muscle is composed
27 by different cell populations. Some studies in mice suggest that 30-35% of fiber nuclei
28 are satellite cells at birth, declining to 5-7% in adults. The values also vary in muscles
29 with different fiber types [20-22]. In human muscles, the percentage seems to be the
30 same in adults ($4\% \pm 2\%$), although there are lack of details in younger muscles [23].

31 Myoblasts cultures have provided a model for studying the mechanism of
32 signaling and molecular pathways used by skeletal muscle *in vivo* to regulate
33 hypertrophy and atrophy [24]. Studies utilize hydrogen peroxide as the main source of
34 free radical production, showing that a positive relationship between H_2O_2 or

1 Fe₂SO₄/H₂O₂, oxidative modifications and protein degradation by the proteolytic
2 pathways, in myotubes, can be found [25-27]. Despite these studies, there is a lack of
3 *in vitro* studies about the specific generation of other reactive species in the early
4 adaptation driven by oxidative modifications. The pyrogallol (1,2,3-Trihydroxybenzene)
5 has been used in several studies as O₂⁻ generator to evaluate the effect of the anion
6 in cultured cells [28-33].

7 Considering the exposed and that the metabolic and adaptative demands are
8 different in different cell populations, it seems reasonable to suppose that the effect of
9 different reactive species are different in the same cell population, and that the effect
10 of the same reactive specie is different in different levels of cell differentiation. Thus,
11 the main objective of this study was to investigate the different oxidative sensitivities of
12 C2C12 myoblasts and C2C12 myotubes under the generation of superoxide anion by
13 pirogallol. Our hypothesis was that crescent concentrations of superoxide lead to
14 oxidative-induced modifications that may result in activation of proteolytic pathways at
15 different stages of myogenic differentiation.

16

17 **Materials and Methods**

18 **Cell Culture**

19 Myoblasts derived from skeletal muscle of mice C2C12 (ATCC[®] CRL-1772[™];
20 ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium
21 (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic penicillin-
22 streptomycin at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO₂ (Sanyo CO₂
23 Incubator; Sanyo, Kitanagoya, Aichi). For myoblasts, the experiments were performed
24 on cells in the confluent state (90-95%). Myotubes were formed by allowing confluent
25 myoblast cultures to differentiate for 9 days [25,34] in DMEM supplemented with 2%
26 horse serum, 1% antibiotic penicillin-streptomycin, with changes of medium every 2
27 days. The muscle cells were examined for evidence of myotube formation by inverted
28 microscopy.

29 **Treatment**

30 Myoblast were tretated after cells reach the confluent state, the myotubes after
31 9 days of differentiation [25,34]. The cells were stimulated with pyrogallol (Sigma-
32 Aldrich[™], St. Louis, MO, USA) in the final concentrations of 50; 100; 250; 500 μM [30]
33 diluted in DMEM without serum for 30 minutes [25], washed twice with PBS, and then
34 harvested for analysis.

1 **Cell Viability**

2 The alterations in C2C12 viability induced by superoxide anion were analyzed
3 by Trypan blue exclusion assay. The cells were counted with trypan blue (0.05 %)
4 using a Neubauer chamber after the treatment. Cells were classified as viable (no
5 staining) and unviable (blue staining) to determine the percentage of viable cells [35].

6 **Cytotoxicity assays**

7 The cytotoxicity of different concentrations of superoxide anion was assessed
8 by MTT reduction [36] and neutral red uptake (NR) [37]. The MTT assay evaluate the
9 metabolic activity of cells based on capacity of the viable cells convert 2-(3,5-
10 Diphenyltetrazol-2-ium-2-yl)-4,5-dimethyl-1,3-thiazole bromide (MTT; Sigma-
11 Aldrich™, St. Louis, MO, USA) into a purple formazan. The formazan was solubilized
12 in DMSO and measured spectrophotometry at 570 nm. The NR analyse the ability of
13 viable cells to incorporate the dye neutral red (Neutral Red; Sigma-Aldrich™, St. Louis,
14 MO, USA) into the lysosomes. The quantity of dye incorporated into cells is measured
15 by spectrometry at 540 nm after use a NR diluent (1% glacial acetic acid in 50%
16 ethanol), and is directly proportional to the number of cells with an intact membrane.
17 When the effects of the cell-permeable O₂⁻ scavenger Tiron (5 mM; Sigma-Aldrich™,
18 St. Louis, MO, USA) were evaluated the cells were preincubated for 1 hour before the
19 stimulation with pyrogallol [29].

20 **Total Thiols**

21 In order to evaluate if superoxide disturbs the total –SH content, total thiol levels
22 were determined using a spectrophotometry assay based on the reaction of 5,5'-
23 dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB; Sigma-Aldrich™, St. Louis, MO, USA) with
24 sulfhydryl groups to yield a colored product at 412nm [38]. Total thiol groups were
25 calculated using a calibration curve provided by known concentrations of GSH (Sigma-
26 Aldrich™, St. Louis, MO, USA), and the results were expressed in micromolar
27 GSH/miligram of protein.

28 **Chemiluminescence stimulated by tert-butyl hydroperoxide**

29 Chemiluminescence, an indicator of lipid peroxidation, estmulated by tert-butyl
30 hydroperoxide was assessed in Lumat³ LB 9508 Single Tube Luminometer (Berthold,
31 Germany), with a response range of 380–630 nm [39]. A kinetic capture of
32 chemiluminescence was performed for 30 min, followed by linearization of the data.
33 Results were expressed in relative light units/miligram of protein.

34 **Carbonyl protein content**

1 Carbonyl proteins are a modification caused by exposure of proteins to oxidative
2 stress. The carbonyl protein content was measured by the enzyme-linked
3 immunosorbent assay (ELISA) [40]. Samples attached to the ELISA plate were reacted
4 with dinitrophenylhydrazine (DNPH, Sigma-Aldrich™, St. Louis, MO, USA). The
5 protein-conjugated DNP was probed by an anti-DNP primary antibody produced in
6 rabbit (Sigma™, D-9656), and then a second antibody conjugated with horseradish
7 peroxidase (anti-rabbit IgG secondary antibody HRP produced in goat- Sigma™, A-
8 0545) was added for quantification. The absorbance was read at 490 nm. The results
9 were calculated using a Bovine serum albumin (BSA) standard curve and expressed
10 in nmol carbonyl proteins/miligrams of total proteins.

11 **Proteolytic Activity**

12 Chymotrypsin-like proteolytic activity was measured using a Proteasome Glo™
13 Chymotrypsin-like Cell Assay kit (Promega™, Madison, WI, USA Cat n° G8620)
14 following the manufacturer's protocol. This assay estimates the activity of the 20S
15 proteasome. Calpain proteolytic activity was measured using Calpain-Glo Protease
16 Assay kit (Promega™, Madison, WI, USA Cat n° G8501) following the manufacturer's
17 protocol. The luminescent assay measures calpain I and II activities. In both cases, the
18 luminescent signal was detected with a Glo-Runner microplate reader luminometer
19 (Turner, Sunnyvale, CA), and the results were expressed as relative light units
20 (RLU)/milligram of protein.

21 **Protein concentration**

22 Protein concentration was determined spectrophotometry at 660 nm by the
23 method of Lowry *et al.* [41] modified by Miller [42]. BSA was used as standard.

24 **Statistical Analysis**

25 Data were analyzed using GraphPad Prism (version 6; San Diego,
26 CA, USA). The results were shown as means \pm SD, using one-way analysis of
27 variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test. Two-way ANOVA
28 was used to analyze the chemiluminescence curves. Shapiro-Wilk were used for
29 normality test. Differences were considered significant if $P < 0.05$ for all analyses
30 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, and *** $p < 0.0001$). Only the differences between control and
31 treated groups were indicated.

1 Results

2 Effects of Superoxide in Myoblasts

3 The superoxide, in the concentrations used, has no effect in viability of
4 myoblasts (Figure 1A). Even the higher concentrations of 250 and 500 μM were not
5 able to decrease the viability of myoblasts.

6 The cellular metabolic activity was investigated by MTT assay and neutral red
7 assay. Many oxidoreductase enzymes are capable of catalyze electron transfer from
8 an electron donor to MTT, most commonly studied systems are the oxidoreductases
9 of the mitochondrial electron transport chain (p.ex. NADPH oxidase), but numerous
10 other cellular dehydrogenases, oxidases and peroxidases have been shown to reduce
11 tetrazolium dyes biochemically [43]. Neutral red assay is based on the ability of viable
12 cells to incorporate and bind the dye neutral red, which penetrates cell membranes
13 and concentrates in the lysosomes. The amount of retained dye is proportional to
14 lysosomal integrity and depends on the cell's capacity to
15 maintain pH gradients, through the production of ATP [44]. Only the concentration of
16 500 μM significantly was able to reduce the metabolism of myoblasts in the MTT assay
17 (Figure 1B). On the neutral red assay, both concentrations of 250 and 500 μM were
18 capable of diminish the metabolic activity (figure 1C). Conversely, the addition of Tiron
19 scavenger inhibited the effects attributed to superoxide on MTT assay and neutral red
20 assay.

21 Literature has evidenced that the thiol in cells and tissues can be a good
22 biomarker of general oxidative stress or redox balance, since they are the first target
23 of most oxidizing species [45]. In the present study, none superoxide concentration
24 could cause any change in thiols levels in myoblasts (Figure 2A). However, lipid
25 peroxidation in myoblasts evaluated by chemiluminescence showed different curves
26 in all concentrations, but only the concentration of 500 μM was significantly ($p < 0.0001$)
27 different from control group (Figure 2B). Although carbonyl proteins levels are
28 important markers of protein oxidation, in myoblasts there were no significant
29 differences in the carbonyl protein content between groups (Figure 2C). The results of
30 chemiluminescence, the effect of the superoxide in both proteolytic parameters
31 analyzed, chymotrypsin-like activity and calpain activity, appear to increase in
32 accordance with the concentration, but there were no significant differences observed
33 between groups (Figure 3).

1 The results showed on myoblasts, none superoxide concentration used
2 influenced myotubes viability (Figure 4A) or metabolic activity evaluated by MTT
3 (Figure 4B). In NR assay, the 500 μM concentration was capable of reducing the
4 metabolism in myotubes (Figure 4C). The differences showed suggest that myotubes
5 are less sensitive in these parameters than myoblasts. The scavenger Tiron inhibited
6 the effect attributed to superoxide on NR assay. No changes were also detected
7 between groups in myotubes when the total thiols levels (Figure 5A) and
8 chemiluminescence (Figure 5B) were analysed. However, the protein carbonyl levels
9 increased significantly already at the concentration of 100 μM of pyrogallol (100 and
10 250 μM **: $p < 0.001$; 500 μM ***: $p < 0.0001$ - Figure 5C). Protein carbonyl levels is the
11 most used marker of protein oxidation and indicates a severe oxidative damage [46].
12 Although oxidized proteins activate proteolytic pathways, no significant differences
13 were detected on proteolytic activity. Nor chymotrypsin-like or calpain activities assays
14 show any effect when myotubes were exposed to superoxide anion production (Figure
15 6). To be noticed, clear differences between myoblasts and myotubes could be
16 demonstrated when the same amount of superoxide anion was generated.

17 **Discussion**

18 Reactive species are involved in different signaling events leading to muscle
19 adaptation to both hypertrophy or atrophy. This contradictory signaling function of ROS
20 is probably related with differences between oxidant species, divergent magnitude and
21 temporal pattern [4]. Studies assessing the effects of ROS typically utilize hydrogen
22 peroxide and evaluate its effects after a period of time exposure [25-27]. As the
23 superoxide is commonly the first ROS produced in biological systems, an elevated
24 level can be found in muscle fibers under pathological conditions and cause severe
25 damage to the proteins, nucleic acids and phospholipids, thereby leading to increased
26 oxidative stress [11]. In this work we investigated the superoxide anion generation *in*
27 *vitro* and its effects on cell metabolism, redox balance and proteolytic activity of C2C12
28 cell line.

29 Our results show that even the concentration of 500 μM of pyrogallol was not
30 able of promoting decrease on the viability by trypan blue exclusion assay neither in
31 myoblasts nor in myotubes, no clearly effects on the plasma membrane integrity were
32 induced by superoxide anion. The effects of superoxide in higher concentration leading
33 to apoptosis were already described [29,33]. Our intention was to evaluate the effects
34 of superoxide at non-lethal concentrations and analyze the initial cell adaptation. Thus,

1 we considered the purpose reached due the facts that none of the concentrations used
2 on myoblasts or myotubes were lethal to the cell.

3 The results of MTT assay showed that metabolic activity of some enzymes are
4 decreased in the concentration of 500 μM in myoblasts. We can attribute this
5 differences to reduction of the oxidoreductases at the mitochondrial electron transport
6 chain [36]. ROS can lead to mitochondrial dysfunction and may result in different
7 changes such as increased production of RS, calcium release and activation of redox
8 signaling which may lead to cellular adaptation to regulate cell survival [7]. Lysosomal
9 function assessed by NR assay had greater reduction when compared to MTT. Both
10 myoblasts (250 and 500 μM) and myotubes (500 μM) revealed decreased cellular
11 activity. This reduced uptake and binding of NR reflects alterations of lysosomal
12 membrane that can lead to fragility of this organelle [47]. ROS are able to destabilize
13 the lysosomal membrane and this fact may result in: release of calcium, apoptotic
14 signalling by cathepsins, or even total lysosomal rupture that induces necrosis [6]. The
15 analysis of these parameters (MTT and NR) in myotube reveals that in this stage of
16 the differentiation the organelles, or even the cells, are less sensitive to the effects of
17 superoxide.

18 Low molecular mass thiols and protein thiols, by their ability to be reversibly
19 oxidized, are recognized as key components involved in the maintenance of redox
20 state. Keep optimal reduced/oxidized thiols ratios in the cell is important to regulation
21 of protein redox status. Changes in this proportion can influence a number of target
22 proteins by causing oxidation or even lead to substantial thiolation [48]. Our results
23 showed no change in total thiol levels at any stage of differentiation. As there was no
24 decrease in the thiols levels, we can infer that thiolation is not occurring at this time
25 point. In addition, we tried to evaluate the superoxide dismutase activity to investigate
26 another antioxidant parameter, and also due to its importance in superoxide
27 dismutation. However, the values of inhibition could not be detected (data not show)
28 by means of the method described by Marklund and Marklund [49]. This result was
29 possibly due to the fact that the levels of SOD found in myoblasts or myotubes were
30 not enough to promote pyrogallol inhibition and, consequently, sensitivity for
31 colorimetric analysis in cell culture. Furthermore, skeletal muscle has modest levels of
32 SOD, catalase e GSH [10].

33 On the other hand, chemiluminescence in myoblasts demonstrated significantly
34 increase of lipid hydroperoxides at the concentration of 500 μM . Lipid peroxidation can

1 be described generally as a process which oxidants attack lipids from membranes and,
2 according to specific cellular metabolic circumstances and repair capacities, the cells
3 may promote cell survival or induce cell death [50]. We observed no changes in trypan
4 blue assay, which suggests that there was no alteration of the cell membrane
5 permeability. However, the MTT and NR assays suffered the effects of superoxide
6 anion generation. We can assume that the most part of lipid peroxidation happened in
7 organelles membranes, or at least in membranes localized within the cell. In the
8 present study, lipid peroxidation altered mitochondrial membrane and lysosome, which
9 triggered changes in permeability leading to dysfunction of these organelles [6,7].

10 In other aspects related to dysfunction of inner cell contents, several human
11 diseases are related with protein carbonylation such as Alzheimer disease [46], cancer
12 cachexia [14] and chronic lung disease [51]. In some of them, specifically the
13 myofilament proteins can be strongly carbonylated as in ischemia/reperfusion,
14 diabetes and COPD [51]. In our study, the concentration of superoxide used had no
15 effect in protein carbonylation content in myoblasts. In contrast, in myotubes only the
16 concentration of 50 μM was not capable of increase these levels. From 100 μM , all
17 concentrations were able to induce severe protein oxidation. These different results
18 between the cells at different levels of differentiation may be due to the fast protein
19 turnover that occurs in C2C12 cell line [52], especially as the proteasome activity is
20 higher in myoblasts than in myotubes [53]. This data corroborates with our results in
21 the proteolytic activity in absolute values, which the value of myoblast is 20% greater
22 than of myotube.

23 There was no significantly difference in the proteolytic activity of any cells,
24 chymotrypsin-like activity and calpain activity. Despite the oxidative changes found,
25 the degradation pathways were not increased in myoblast. It seems tended to
26 increase, but values were not considered significant. As mentioned, the dysfunction of
27 mitochondria and lysosomes caused by RS can release calcium. Other organelles may
28 also do that, such as the sarcoplasmic reticulum and the cell membrane through
29 changes in ion channels caused by oxidative damage [54]. Calpains are a family of
30 cellular proteases that are activated by cytosolic free calcium and can cause initial
31 proteolytic modification of some myofibrillar proteins. At the onset of myofibril
32 breakdown, they cleave substrate molecules at a small number of specific sites, so
33 that proteolysis by calpains may be sufficient for targeting fragments to the proteasome
34 system [55,56]. Indeed, mitochondria and lysosome are capable of control the kinetic

1 properties for the uptake, storage and release of Ca^{2+} [57,58]. So, as our results
2 present alterations in mitochondrial activity and lysosomal it could be possible an
3 increase in calpain activity, as could be seen on the tendency, but this was not
4 sufficiently observed.

5 Most oxidative modifications on proteins cannot be repaired, such as
6 carbonylated proteins, and must be removed by the ubiquitin-proteasome system, that
7 is the most non-lysosomal active mechanism of protein turnover in cells [59]. The 20S
8 is the main site of protein degradation on the proteasomal system and can degrade
9 oxidized proteins without ubiquitination [4,8,59]. The association of 19S regulator (one
10 or two complex) to the 20S results in the formation of the 26S, which prefer degrade
11 native ubiquitinated proteins [8]. Ubiquitination of proteins involves the cooperative
12 action of E1 ubiquitin-activating protein enzymes, E2 ubiquitin-conjugating enzymes
13 and E3 ubiquitin-protein ligase. This is a highly ordered and specific mechanism,
14 because the diversity of enzymes and ubiquitination can form many possibilities of
15 arrangements [8,59]. Ubiquitin chains could be recognized by the 19S regulator,
16 leading to protein unfolding and recycling of the ubiquitin molecules [8]. Our
17 carbonylated proteins results could lead to an increase in proteasome activity,
18 however, there was no significant increase, as in the calpain activity.

19 Gomes-Marcondes e Tisdale [25] demonstrated that with just 30 minutes of
20 exposition to H_2O_2 (100 μM), after 24 hours, there was increased proteasome activity
21 and expression of $\text{E}2_{14\text{k}}$ in myotubes C2C12. Li *et al.* [26] found similar results in
22 C2C12 myotubes, the H_2O_2 (100 μM) stimulates the ubiquitin-conjugating activity after
23 4 hours (continuous exposition) and expression of genes for $\text{E}2_{14\text{k}}$ after 6 hours and
24 E3 proteins, Atrogin1/MAFbx after 3 hours and Murf-1 after 6 hours. McClung *et al.*
25 [27] showed, in C2C12, that myotubes atrophy induced by low doses of H_2O_2 (25 μM
26 continuous exposition) didn't decreased the viability, and requires calpain-1 proteases,
27 what occurs only after 4 hours. All these data demonstrated the effects after some
28 hours, probably those effects need to increase the expression of some regulatory
29 enzymes. The results found by us in the proteolytic activity could show other profile if
30 we analyze after some hours.

31 An important fact to be noted is that the studies developed up to now did not
32 consider the redox modifications that could triggers all these events. Our intention was
33 to evaluate the redox modifications, metabolic activity, protein and lipid oxidation,
34 which are important factors to activate the degradation pathways. The main question

1 is how the effects of ROS in skeletal muscle can promote anabolic responses in some
2 conditions whereas in other promote catabolic signaling? Therefore, to answer this
3 question, it would be necessary to investigate the effects of various ER at different
4 time-points, time of exposure, and concentrations.

5 To conclude, this work promoted evidences about the consequences of a single
6 radicalar specie, at non-lethal concentrations for a short period, on the very beginning
7 of the adaptation process, in two different stages of the differentiation. It seems that
8 the reduction of metabolic activity of organelles represents the first events in myoblasts
9 and myotubes after exposure to superoxide anion. However, lipid peroxidation appears
10 to be a critical event in myoblasts, whereas protein oxidation seems to be the key event
11 on myotubes. Both short time responses to superoxide anion generation are not yet
12 capable of producing increased proteolytic activity.

14 **Acknowledgments**

15 This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
16 Nível Superior (CAPES). The authors are grateful to Luiz Carlos Carvalho Navegantes
17 of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo - Ribeirão Preto, Brazil, for
18 the supply of C2C12 cells, and to J.A. Vargas and P.S.R. Dionízio-Filho, from the
19 Department of General Pathology of the State University of Londrina, for their excellent
20 technical assistance.

22 **References**

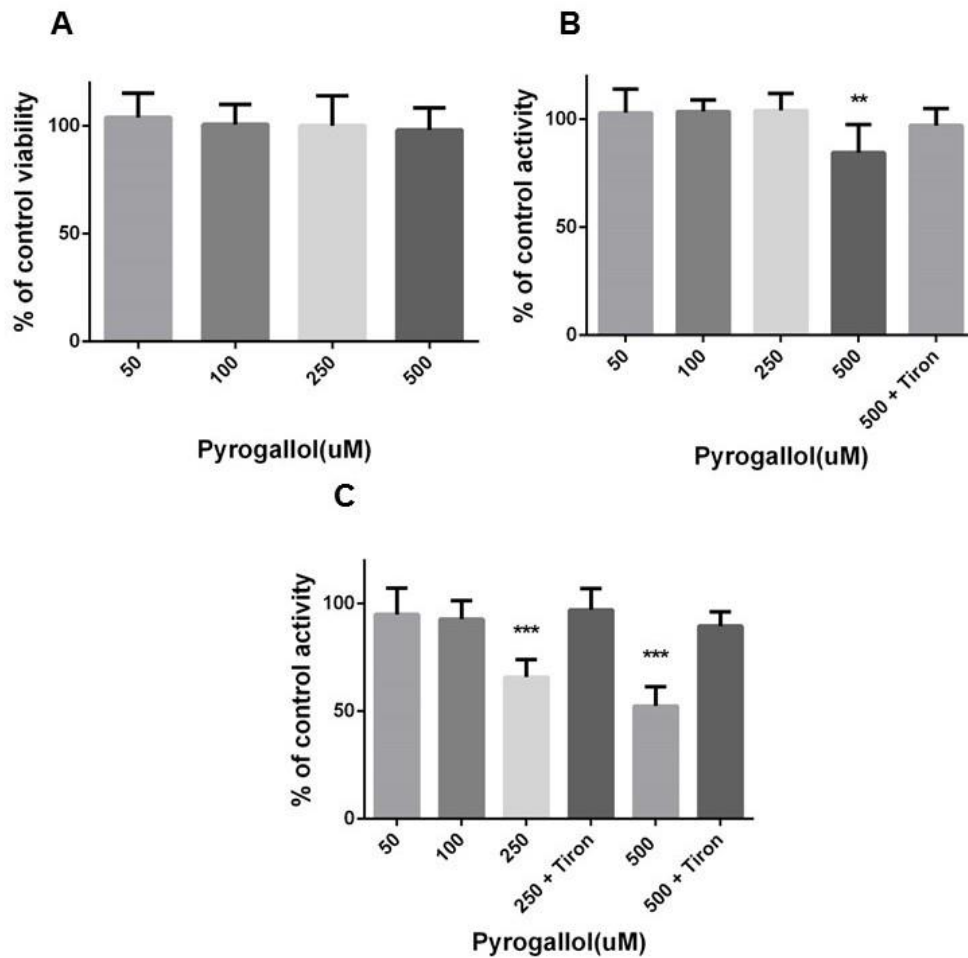
- 23 [1] RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS)
24 homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal**, v. 24, n. 5, p.
25 981-90, May 2012
- 26 [2] ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radic**
27 **Biol Med**, v. 28, n. 3, p. 463-99, Feb 1 2000.
- 28 [3] HURD, T. R.; MURPHY, M. P. Biological Systems Relevant for Redox Signaling
29 and Control. In: (Ed.). **Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine:**
30 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.
- 31 [4] POWERS, S. K. et al. Reactive oxygen species are signalling molecules for
32 skeletal muscle adaptation. **Exp Physiol**, v. 95, n. 1, p. 1-9, Jan 2010.
- 33 [5] BACHI, A.; DALLE-DONNE, I.; SCALONI, A. Redox proteomics: chemical
34 principles, methodological approaches and biological/biomedical promises. **Chem**
35 **Rev**, v. 113, n. 1, p. 596-698, Jan 9 2013.

- 1 [6] APPELQVIST, H. et al. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic
2 target. **J Mol Cell Biol**, v. 5, n. 4, p. 214-26, Aug 2013.
- 3 [7] BARBOUR, J. A.; TURNER, N. Mitochondrial stress signaling promotes cellular
4 adaptations. **Int J Cell Biol**, v. 2014, p. 156020, 2014.
- 5 [8] HOHN, A.; KONIG, J.; GRUNE, T. Protein oxidation in aging and the removal of
6 oxidized proteins. **J Proteomics**, v. 92, p. 132-59, Oct 30 2013.
- 7 [9] BUTTERFIELD, D. A.; DALLE-DONNE, I. Redox proteomics: from protein
8 modifications to cellular dysfunction and disease. **Mass Spectrom Rev**, v. 33, n. 1,
9 p. 1-6, Jan-Feb 2014.
- 10 [10] HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4
11 ed. Oxford University Press, 2007. 704.
- 12 [11] XU, X. et al. Analysis of superoxide production in single skeletal muscle fibers.
13 **Anal Chem**, v. 82, n. 11, p. 4570-6, Jun 1 2010.
- 14 [12] JACKSON, M. J.; PYE, D.; PALOMERO, J. The production of reactive oxygen
15 and nitrogen species by skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 102, n. 4, p.
16 1664-70, 2007.
- 17 [13] JACKSON, M. J. Redox regulation of skeletal muscle. **IUBMB Life**, v. 60, n. 8, p.
18 497-501, Aug 2008.
- 19 [14] GUARNIER, F. A. et al. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress
20 in rats with Walker 256 solid tumor. **Muscle Nerve**, v. 42, n. 6, p. 950-8, Dec 2010.
- 21 [15] TERRILL, J. R. et al. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies:
22 focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. **FEBS J**, v. 280, n. 17, p. 4149-
23 64, Sep 2013
- 24 [16] TONON, J. et al. Lung injury-dependent oxidative status and chymotrypsin-like
25 activity of skeletal muscles in hamsters with experimental emphysema. **BMC**
26 **Musculoskelet Disord**, v. 14, p. 39, 2013.
- 27 [17] MASON, S.; WADLEY, G. D. Skeletal muscle reactive oxygen species: a target
28 of good cop/bad cop for exercise and disease. **Redox Rep**, v. 19, n. 3, p. 97-106,
29 May 2014.
- 30 [18] BRUNNQUELL, C. R. et al. Oxidative and proteolysis-related parameters of
31 skeletal muscle from hamsters with experimental pulmonary emphysema: a
32 comparison between papain and elastase induction. **Int J Exp Pathol**, Jun 22 2015.
- 33 [19] PUIG-VILANOVA, E. et al. Oxidative stress, redox signaling pathways, and
34 autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung
35 cancer. **Free Radic Biol Med**, v. 79, p. 91-108, Feb 2015.
- 36 [20] ALLBROOK, D.B.; HAN, M.F.; HELLMUTH, A.E.. Population of muscle satellite
37 cells in relation to age and mitotic activity. **Pathology**. v.3(3):223-43, 1971

- 1 [21] CARDASIS, C.A.; COOPER, G.W. An analysis of nuclear numbers in individual
2 muscle fibers during differentiation and growth: a satellite cell-muscle fiber growth
3 unit. **J Exp Zool**. v.191(3):347-58, 1975.
- 4 [22] SCHULTZ, E. Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle. **Am J**
5 **Anat**. v.147(1):49-70, 1976.
- 6 [23] BOLDRIN, L.; MUNTONI, F.; MORGAN, J.E. Are human and mouse satellite
7 cells really the same? **J Histochem Cytochem**. v.58(11):941-55 , 2010
- 8 [24] SHARPLES, A. P.; STEWART, C. E. Myoblast models of skeletal muscle
9 hypertrophy and atrophy. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 14, n. 3, p. 230-6,
10 May 2011.
- 11 [25] GOMES-MARCONDES, M. C.; TISDALE, M. J. Induction of protein catabolism
12 and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. **Cancer Lett**, v. 180,
13 n. 1, p. 69-74, Jun 6 2002.
- 14 [26] LI, Y. P. et al. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and
15 expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. **Am**
16 **J Physiol Cell Physiol**, v. 285, n. 4, p. C806-12, Oct 2003.
- 17 [27] MCCLUNG, J. M. et al. Calpain-1 is required for hydrogen peroxide-induced
18 myotube atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 296, n. 2, p. C363-71, Feb 2009.
- 19 [28] KIM, S. J. et al. Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural
20 antioxidants. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 59, n. 5, p. 822-6, May 1995.
- 21 [29] MORENO-MANZANO, V. et al. Selective involvement of superoxide anion, but
22 not downstream compounds hydrogen peroxide and peroxynitrite, in tumor necrosis
23 factor-alpha-induced apoptosis of rat mesangial cells. **J Biol Chem**, v. 275, n. 17, p.
24 12684-91, Apr 28 2000.
- 25 [30] KOSMIDOU, I. et al. Production of interleukin-6 by skeletal myotubes: role of
26 reactive oxygen species. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 26, n. 5, p. 587-93, May
27 2002.
- 28 [31] YAMADA, J. et al. Cell permeable ROS scavengers, Tiron and Tempol, rescue
29 PC12 cell death caused by pyrogallol or hypoxia/reoxygenation. **Neurosci Res**, v.
30 45, n. 1, p. 1-8, Jan 2003.
- 31 [32] PARK, W. H. et al. A superoxide anion generator, pyrogallol induces apoptosis
32 in As4.1 cells through the depletion of intracellular GSH content. **Mutat Res**, v. 619,
33 n. 1-2, p. 81-92, Jun 1 2007.
- 34 [33] KIM, S. W. et al. A superoxide anion generator, pyrogallol, inhibits the growth of
35 HeLa cells via cell cycle arrest and apoptosis. **Mol Carcinog**, v. 47, n. 2, p. 114-25,
36 Feb 2008.
- 37 [34] BURATTINI, S. et al. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle
38 development: morpho-functional characterization. **Eur J Histochem**, v. 48, n. 3, p.
39 223-33, Jul-Sep 2004.

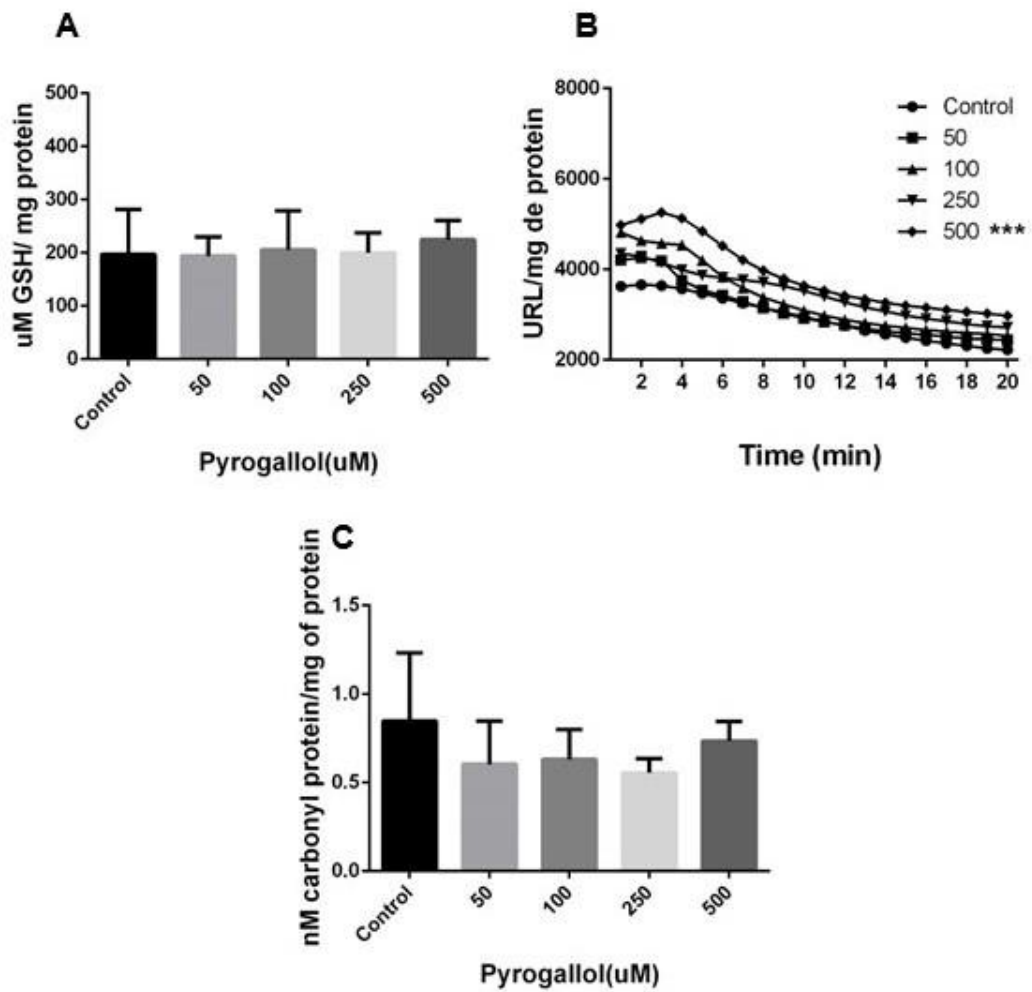
- 1 [35] MARINELLO, P. C. et al. Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-
2 MB-231 human breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA
3 damage, and transforming growth factor beta1 induction. **Tumour Biol**, Nov 11 2015.
- 4 [36] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:
5 application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-
6 2, p. 55-63, Dec 16 1983.
- 7 [37] PLUMB, J. A.; MILROY, R.; KAYE, S. B. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-
8 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on
9 chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. **Cancer Res**, v. 49,
10 n. 16, p. 4435-40, Aug 15 1989
- 11 [38] HU, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma.
12 **Methods Enzymol**, v. 233, p. 380-5, 1994.
- 13 [39] GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated
14 chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and
15 muscle. **Free Radic Biol Med**, v. 10, n. 2, p. 93-100, 1991.
- 16 [40] ALAMDARI, D. H. et al. High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay
17 (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of
18 protein. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 10, p. 1362-7, Nov 15 2005.
- 19 [41] LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol**
20 **Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.
- 21 [42] MILLER, G. L. Protein Determination of Large Numbers of Samples. **Analytical**
22 **Chemistry**, v. 31, n. 5, p. 964-964, 1959/05/01 1959.
- 23 [43] BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell
24 biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnol Annu Rev**, v. 11, p.
25 127-52, 2005.
- 26 [44] REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the
27 estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nat Protoc**, v. 3, n. 7, p. 1125-31, 2008.
- 28 [45] HILL, B. G.; BHATNAGAR, A. Protein S-glutathiolation: redox-sensitive
29 regulation of protein function. **J Mol Cell Cardiol**, v. 52, n. 3, p. 559-67, Mar 2012.
- 30 [46] DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. **Trends Mol**
31 **Med**, v. 9, n. 4, p. 169-76, Apr 2003.
- 32 [47] BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using
33 monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of tissue culture**
34 **methods**, v. 9, n. 1, p. 7-9, 1984.
- 35 [48] DALLE-DONNE, I. et al. Molecular mechanisms and potential clinical
36 significance of S-glutathionylation. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 3, p. 445-73,
37 Mar 2008.
- 38 [49] MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in
39 the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur**
40 **J Biochem**, v. 47, n. 3, p. 469-74, Sep 16 1974.

- 1 [50] AYALA, A. et al. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling
2 Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine**
3 **and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 31, 2014.
- 4 [51] BARREIRO, E.; HUSSAIN, S. N. Protein carbonylation in skeletal muscles:
5 impact on function. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 3, p. 417-29, 2010.
- 6 [52] CAMBRIDGE, S. B. et al. Systems-wide proteomic analysis in mammalian cells
7 reveals conserved, functional protein turnover. **J Proteome Res**, v. 10, n. 12, p.
8 5275-84, Dec 2 2011.
- 9 [53] EBISUI, C. et al. Changes of proteasomes and cathepsins activities and their
10 expression during differentiation of C2C12 myoblasts. **J Biochem**, v. 117, n. 5, p.
11 1088-94, May 1995.
- 12 [54] POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular
13 mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p.
14 1243-76, Oct 2008.
- 15 [55] VERBURG, E. et al. Involvement of calpains in Ca²⁺-induced disruption of
16 excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle fibers. **Am J Physiol**
17 **Cell Physiol**, v. 296, n. 5, p. C1115-22, May 2009.
- 18 [56] SAMENGO, G. et al. Age-related loss of nitric oxide synthase in skeletal muscle
19 causes reductions in calpain S-nitrosylation that increase myofibril degradation and
20 sarcopenia. **Aging Cell**, v. 11, n. 6, p. 1036-45, Dec 2012.
- 21 [57] NICHOLLS, D. G. Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium*, v. 38, n. 3-
22 4, p. 311-7, Sep-Oct 2005.
- 23 [58] HOGLINGER, D. et al. Intracellular sphingosine releases calcium from
24 lysosomes. *Elife*, v. 4, 2015.
- 25 [59] CASTRO, J. P. et al. Actin carbonylation: from cell dysfunction to organism
26 disorder. **J Proteomics**, v. 92, p. 171-80, Oct 30 2013.



1

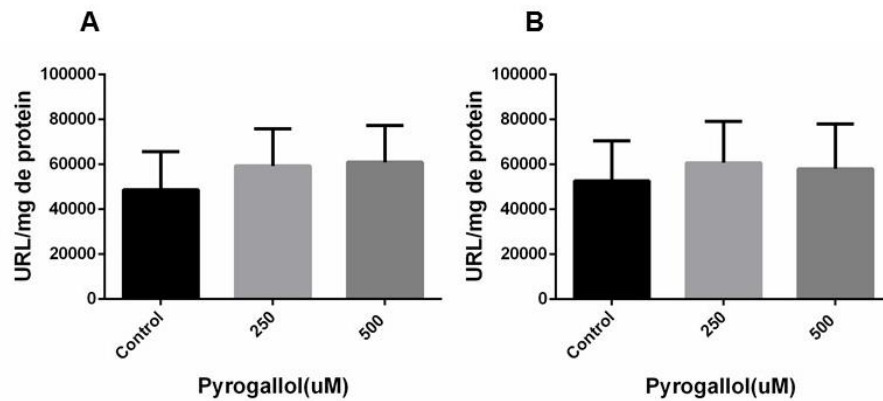
2 **Figure 1. Cytotoxic effect of different concentrations (50,100, 250 and 500 uM) of**
 3 **Pyrogallol in Myoblast C2C12 in the presence or not of Tiron (5mM). A** Cell
 4 viability obtained by trypan blue exclusion. **B** MTT assay. **C** Neutral red assay.
 5 Differences from control are indicated: **: $p < 0.001$; ***: $p < 0.0001$. Groups with Tiron
 6 were preincubated for 1 hour before the stimulation with pyrogallol. Values represent
 7 as percentage of Control, means \pm SD (n=8).



1

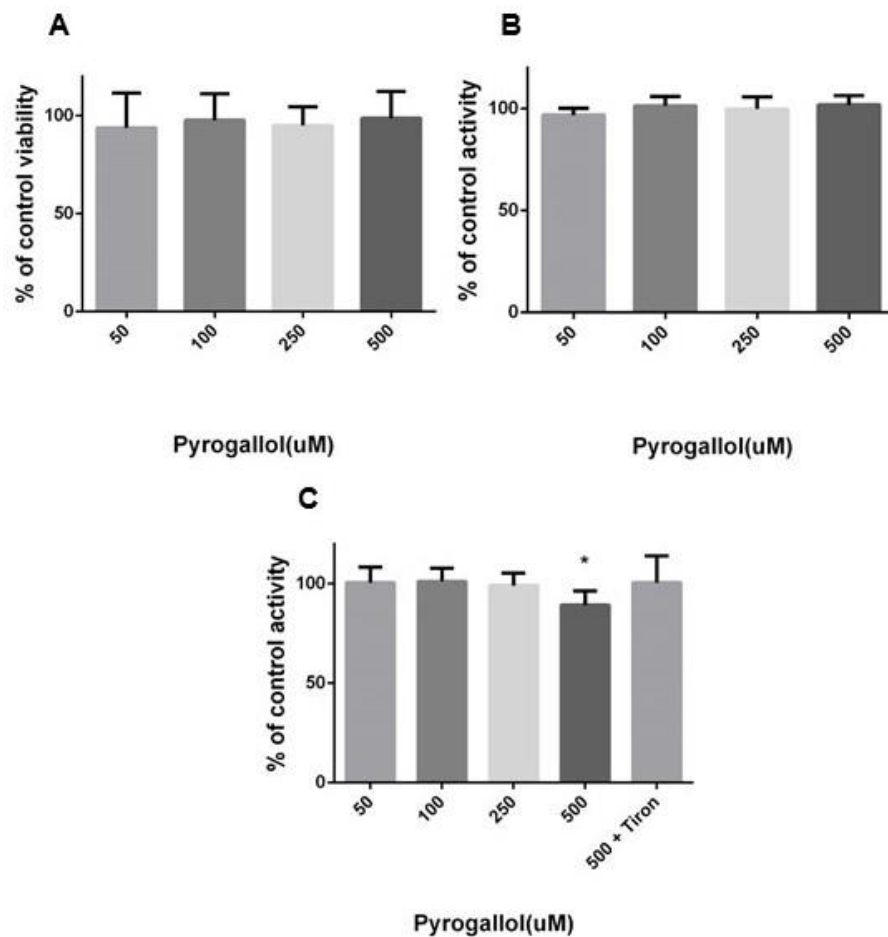
2 **Figure 2. Markers of oxidative stress in Myoblasts C2C12 exposed to different**
 3 **concentrations (50,100, 250 and 500 uM) of Pyrogallol. A Total Thiol levels. B Tert-**
 4 **butyl hydroperoxide-stimulated chemiluminescent curves. C Protein carbonylation**
 5 **levels. Differences from control are indicated: ***: p<0.0001. The values are means ±**
 6 **SD from n=6.**

7



1

2 **Figure 3. Proteolytic activity in Myoblasts C2C12 exposed to different**
 3 **concentrations (50,100, 250 and 500 uM) of Pyrogallol. A Chymotrypsin-like activity**
 4 **levels. B Calpain activity. (n=8)**

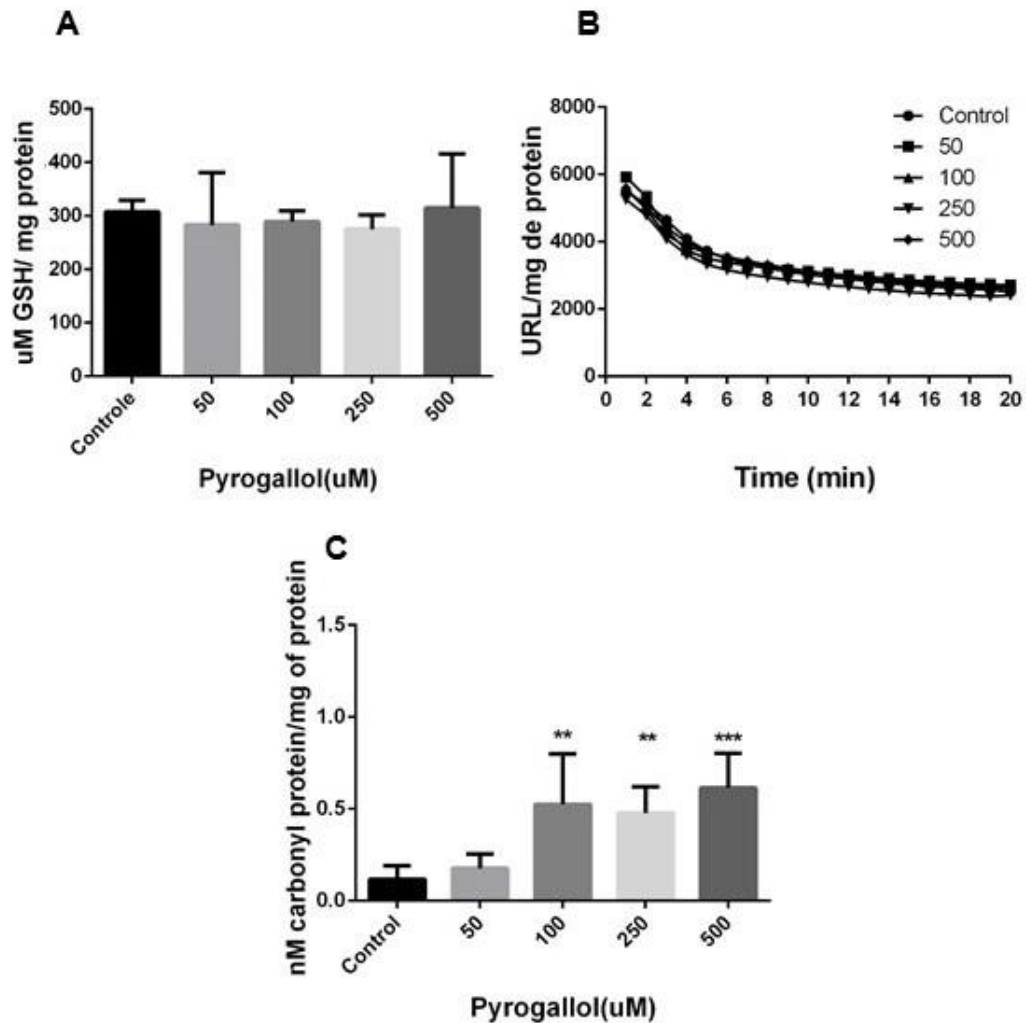


5

6 **Figure 4. Cytotoxic effect of different concentrations (50,100, 250 and 500 uM) of**
 7 **Pyrogallol in Myotubes C2C12 in the presence or not of Tiron (5mM). A Cell**
 8 **viability obtained by trypan blue exclusion. B MTT assay. C Neutral red assay. (n=8).**

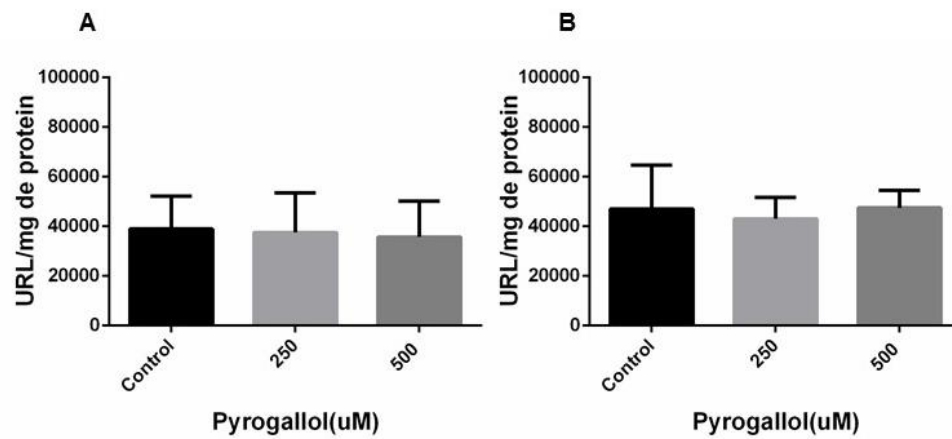
1 Differences from control are indicated: *: $p < 0.05$. Groups with Tiron were preincubated
 2 for 1 hour before the stimulation with pyrogallol. Values represent as percentage of
 3 Control, means \pm SD (n=8).

4



5

6 **Figure 5. Markers of oxidative stress in Myotubes C2C12 exposed to different**
 7 **concentrations (50,100, 250 and 500 uM) of Pyrogallol. A Total Thiol levels. B Tert-**
 8 **butyl hydroperoxide-stimulated chemiluminescent curves. C Protein carbonylation**
 9 **levels. Differences from control are indicated: **: $p < 0.001$; ***: $p < 0.0001$. The values**
 10 **are means \pm SD from n=6.**



1

2 **Figure 6. Proteolytic activity in Myotubes C2C12 exposed to different**
3 **concentrations (50,100, 250 and 500 uM) of Pyrogallol. A Chymotrypsin-like activity**
4 **levels. B Calpain activity. The values are means \pm SD from n=8.**