

Considerações Críticas e Metodológicas na Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio em Células Musculares Durante Contrações

revisão

Leonardo R. Silveira

*Departamento de Fisiologia e
Biofísica – IB, UNICAMP,
Campinas, SP.*

RESUMO

Uma excessiva produção de espécies reativas pode ser prejudicial, superando a capacidade antioxidante e conduzindo a um desequilíbrio redox. A maioria das evidências da formação de espécies reativas em células musculares são “indiretas”, ao passo que as evidências “diretas” ainda são escassas. As razões para este fato são múltiplas. Esta revisão sugere a utilização de sondas fluorescentes como DCFH (reativa ao H₂O₂), DAF-2 (reativa ao NO) e fluoróforo nitróxido (reativa ao O₂⁻) para determinação dessas espécies. Em adição, o presente estudo sugere que: 1) as medidas “indiretas” de ataque oxidativo em amostras sanguíneas não necessariamente refletem o ataque oxidativo ocorrido nas células musculares; 2) amostras de músculos isolados e homogenatos podem apresentar uma grande quantidade de tecido vascular contendo células endoteliais, hemácias e leucócitos, os quais podem gerar EROs e NO, dificultando a interpretação dos resultados; 3) as sondas fluorescentes DCFH-DA/DCFH, DAF-2-DA/DAF-2 e nitróxido são sensíveis na detecção do H₂O₂, NO e O₂⁻ respectivamente, em tecido muscular durante contrações; 4) como método alternativo no estudo da produção de EROs e NO em músculo esquelético, culturas de células musculares e fibra muscular isolada são indicados como modelos experimentais. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/6:812-822**)

Descritores: Estresse oxidativo; Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

ABSTRACT

Critical and Methodological Analyses on the Determination of Reactive Species in Skeletal Muscle Cells During Contractions.

An excessive level of these species may be harmful as it may overcome the antioxidant capacity. Most evidences for ROS and NO formation in muscle cell are indirect whereas direct evidences are scarce. The present review suggests as an alternative method either fluorescent DCFH, DAF-2 or fluorescamine toward H₂O₂, NO and O₂⁻ measurements, respectively in muscle cell. In addition, it was concluded that: 1) the “indirect” measurements of ROS and NO in blood sample do not reflect oxidative attack occurred in muscle cells during contractions; 2) isolated muscles and homogenates may contain a large amount of endothelial cells, red blood cells and leukocytes which may generate ROS and NO; 3) the fluorescent DCFH-DA/DCFH, DAF-2-DA/DAF-2 and fluorescamine are sensitive in detection of H₂O₂, NO and O₂⁻ respectively, in muscle cell during contractions; 4) muscle cell culture and isolated muscle fiber are indicated as experimental models to study ROS and NO formation in muscular tissue. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/6:812-822**)

Keywords: Oxidative stress; Reactive oxygen species and nitric oxide

Recebido em 13/10/03

Revisado em 26/04/04 e 29/06/04

Aceito em 15/07/04

HÁ CERCA DE 2,4 bilhões de anos, surgiram os primeiros organismos aeróbios na forma de algas marinhas. O aparecimento destes organismos foi considerado um grande marco na história da evolução biológica, pois a utilização do O₂ como acceptor final de elétrons no processo de fosforilação oxidativa aumentou consideravelmente a eficiência na produção de energia a partir dos alimentos (1). Ao compararmos a oxidação aeróbia da molécula de glicose com sua oxidação anaeróbia, veremos que no primeiro caso a produção de energia é da ordem de 12 vezes maior! Portanto, sendo a glicose um elemento essencial em nossa dieta, teríamos que ingerir cerca de 12 vezes mais alimentos do que normalmente ingerimos diariamente se não fossemos, é claro, organismos aeróbios (2). Porém, embora o O₂ desempenhe um papel fundamental no processo de fosforilação oxidativa, permitindo ao nosso organismo utilizar a energia proveniente de nutrientes como carboidratos, lipídios e proteínas com maior eficiência, uma pequena fração do seu consumo mitocondrial é transformada em espécies reativas de oxigênio (EROs) (1,3). A formação dessas espécies foi inicialmente demonstrada com o clássico estudo de McCord & Fridovich (4), mostrando a formação do radical O₂⁻ pela enzima xantina oxidase. Anos depois, estes mesmos autores demonstraram, ainda, que as EROs são causadoras de danos oxidativos aos tecidos em organismos vivos e que certos antioxidantes podem proteger os tecidos contra esses danos (5). A partir de então, houve um grande avanço nas investigações envolvendo a formação de EROs em organismos vivos, embora, em tecido muscular, esse avanço foi apenas modesto como demonstrado pelo número de citações nessa área nos dias atuais.

Em células musculares, as EROs, quando produzidas em baixas concentrações, exercem importantes papéis fisiológicos, como aumento da permeabilidade ao Ca²⁺ (6), aumento da força de contratilidade (7) e regulação da expressão gênica (8). As contrações musculares podem, também, aumentar a formação de óxido nítrico (NO), uma vez que altos níveis de óxido nítrico sintase (NOS) foram encontrados em células musculares (9). Essas espécies também têm sido apontadas como responsáveis por importantes papéis fisiológicos, como regulação metabólica, regulação do fluxo sanguíneo, expressão gênica e modulação no processo de contração muscular (10,11). Além desses importantes papéis, a excessiva produção de EROs e NO pelas células musculares durante as contrações musculares contribuem significativamente com a redução da força

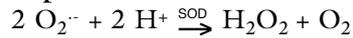
de contratilidade (7,11), acelera os processos de fadiga (6,12) e contribui com aumento das lesões musculares (13,14). Portanto, embora um certo nível dessas espécies seja requerido para manutenção de alguns importantes processos fisiológicos durante contrações, o aumento dessas espécies pode ser potencialmente tóxico, alterando o equilíbrio redox intracelular para um estado mais oxidado. Em resumo, embora por mecanismos desconhecidos, evidências sugerem que, em baixas concentrações, as EROs e ERNs são essenciais para a manutenção da performance durante as contrações musculares, mantendo os níveis de força elevados. Ao passo que, em concentrações altas, essas espécies reduzem substancialmente os níveis de força muscular, como demonstrado em situação de fadiga muscular durante experimentos *in vitro* (6,7,15).

Podemos, então, agora, considerar a molécula de oxigênio como essencial e, ao mesmo tempo, tóxica ao nosso organismo. Diante desse paradoxo, e se isso é realmente verdadeiro, o que dizer do exercício físico onde o consumo de O₂ sistêmico é aumentado em 10 vezes e o intramuscular acima de 100 vezes (16)? Se 2–5% do O₂ consumido reconhecidamente dá origem às EROs, e se essa relação é sempre mantida, seria então lógico esperar que, durante o exercício intenso, a formação de EROs aumente proporcionalmente ao consumo de O₂. Então, com base nessa hipótese, seria ainda adequado assumirmos sem nenhuma surpresa que o exercício físico constitui um excelente modelo experimental para estudar a formação de EROs e NO e suas conseqüências ao nosso organismo. Porém, apesar desse status atribuído ao exercício, até o momento existem ainda poucas evidências “diretas” da formação de EROs e NO em células musculares durante contrações. As razões para este fato ainda não foram esclarecidas, mas certamente podem ser atribuídas à falta de padronização entre os modelos de exercício utilizados, as características do músculo ou grupo muscular utilizado, o status nutricional, antioxidante e de treinamento e, principalmente, o método para detecção das EROs e NO empregados. Portanto, embora exista um consenso de que as EROs são responsáveis pelo aumento das oxidações intracelulares, como demonstrado indiretamente em estudos *in vitro* (1,13,17), poucas são as evidências “diretas” da formação intracelular dessas espécies em células musculares durante contrações. Com base nesses problemas metodológicos, o objetivo dessa revisão foi de despertar uma visão crítica e criteriosa na elaboração e na escolha de um modelo experimental adequado para determinação de EROs e NO em tecido muscular esquelético durante atividade.

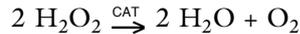
é gerado a partir dos substratos arginina e O₂ por uma família de 3 isoformas da óxido nítrico sintase (NOS): NOS endotelial (eNOS), NOS neural (nNOS) e a NOS induzível (iNOS) (figura 2). Estudos anteriores têm mostrado que essas isoformas exibem uma ampla distribuição tecidual, incluindo o tecido muscular esquelético (9,11). O NO é consideravelmente menos reativo que o radical ·OH, porém sua interação com o O₂⁻ produz outra ERN, o peróxido nitrito (ONOO⁻), capaz de se decompor produzindo potentes oxidantes em pH fisiológico, como descrito na reação VIII. Ao contrário de outras EROs e a exemplo do ·OH, o NO, bem como o ONOO⁻, não possuem uma enzima antioxidante específica, sendo suas concentrações reguladas pelos níveis de antioxidantes não enzimáticos e, principalmente, pelas concentrações de O₂⁻ disponíveis (26,27). Esta reação é 3 vezes mais rápida que a dismutação enzimática do superóxido pela superóxido dismutase (28).
O₂⁻ + NO → ONOO⁻ (VIII) (28,29).

Embora os neutrófilos saibam aproveitar o potencial oxidante das EROs para proteger nosso organismo contra bactérias e outros microrganismos, evidências sugerem que altos níveis de EROs e ERN podem causar sérios distúrbios no estado redox do nosso organismo, incluindo, principalmente, o tecido muscular durante o exercício (14). Esse efeito deletério dessas espécies é conhecido como estresse oxidativo e, quando ocorre, diferentes componentes celulares como lipídios, proteínas e DNA podem sofrer oxidação devido ao ataque das EROs comprometendo as principais funções celulares (6,13,19). Então, a falha na remoção dessas espécies durante o exercício pode resultar em um significativo dano oxidativo aos componentes celulares. Porém, não é surpreendente que nosso organismo, incluindo as células musculares, possua um sofisticado sistema antioxidante para se proteger contra as ações deletérias dos radicais livres. Esse sistema de proteção antioxidante pode ser enzimático ou não enzimático, e ambos trabalham em conjunto para minimizar os efeitos das EROs nos tecidos. O sistema antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-PX), glutathiona redutase (GSSG-GR) e a catalase (CAT). Estas enzimas, como exemplificado nas reações abaixo, são responsáveis pela remoção do ânion superóxido (O₂⁻), hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), respectivamente (3,19).

Superóxido dismutase:



Catalase:



Glutathiona peroxidase:



Glutathiona redutase:



O sistema antioxidante não enzimático inclui, principalmente, as vitaminas E, C, e A, glutathiona reduzida (GSH), ubiquinona, ácido úrico, L-cisteína, fenilalanina e glicose (19). A maioria desses antioxidantes está estrategicamente compartimentalizada em organelas subcelulares para proporcionar o máximo de proteção contra os danos causados pelas EROs.

Evidências “Indiretas” da Formação de EROs e ERN Durante o Exercício em Células Musculares

Devido à grande importância da regulação intracelular dos níveis de EROs, houve, nos últimos tempos, um grande aumento no número de estudos empregando técnicas de medidas “indiretas” na literatura. Em uma pesquisa recente na base de dados Medline, foi constatado que os métodos para medir ataque oxidativo mais utilizados são etano, pentano, atividade de enzimas antioxidantes, razão GSH/GSSH, quimioluminescência, oxidação de proteínas, malondialdeído (MDA), ácido tiubarbitúrio (TBA) e oxidação de DNA. Embora esses métodos tenham proporcionado evidências de que o músculo esquelético em exercício produz EROs e ERN, todos eles apresentam limitações metodológicas, e alguma análise crítica precisa ser considerada.

Os dois primeiros levam alguma vantagem por permitirem suas análises *in vivo* pela fácil determinação de seus níveis gasosos no ar exalado durante o exercício. Mas a principal crítica está no fato de esses gases coletados serem provenientes não somente do tecido muscular oxidado pelas EROs, mas também de outros tecidos indiretamente envolvidos (30).

Outro método alternativo é a determinação indireta de EROs pela atividade das enzimas de defesa antioxidantes (31,32). Nos últimos anos, alguns estudos têm proposto que a taxa de formação de EROs durante as contrações musculares pode aumentar em função do aumento na taxa de respiração mitocondrial (1). Em adição a este conceito, está bem estabelecido na literatura que tecidos com alto potencial oxidativo possuem uma alta capacidade

antioxidante (19,31). Então, considerando que a geração dessas espécies ou de algum co-produto associado seja um forte estímulo para a *upregulation* da atividade das enzimas antioxidantes, seria muito provável que o exercício intenso crônico fosse um excelente estímulo para um aumento na expressão dessas enzimas. Porém, os estudos de Powers e cols. (31) e Laughlin e cols. (32) em músculo esquelético demonstraram que a hipótese de um aumento no sistema de defesa antioxidante enzimático proporcional ao aumento no consumo de oxigênio mitocondrial parece ainda estar longe de ser confirmada. Então, isso não necessariamente significa que a formação de EROs durante o exercício está intimamente associada com o aumento na atividade das enzimas de defesa antioxidantes. Por exemplo: o treinamento aeróbio, esperado para aumentar a capacidade oxidativa intramuscular, tem falhado para induzir uma *upregulation* ou aumento na atividade da SOD (13,32), ao passo que, para as mesmas condições, a atividade da CAT foi mostrada para sofrer uma *downregulation* ou redução de sua atividade (13,32,33)! Embora as razões para esse fenômeno sejam, ainda, desconhecidas, algumas hipóteses têm sido levantadas. McCord & Fridovich (34), em um elegante estudo, demonstraram que, em pH fisiológico, a taxa de dismutação enzimática ou espontânea do radical superóxido foi idêntica. Em outras palavras, a produção final de peróxido de hidrogênio foi a mesma na presença ou na ausência de SOD. Isso muito provavelmente sugere que, em músculo esquelético, o O_2^- gerado pode rapidamente ser dismutado espontaneamente, atenuando o sinal de expressão da SOD. Outra possibilidade pode estar no aumento da produção intracelular do ONOO⁻ durante as contrações musculares via reação do O_2^- com NO. Nessas condições, a produção de NO pode ser aumentada, favorecendo a manutenção dos níveis basais do O_2^- (26). A razão para redução da atividade da CAT é desconhecida, porém, observações de nosso laboratório (35) e de outros estudos (3,19) sugerem que, em células musculares, a GSH-PX tem maior afinidade pelo H_2O_2 , tornando a atividade da CAT secundária nesse tecido (3). Portanto, nos parece claro, no presente momento, que a atividade do sistema de defesa antioxidante enzimático pode não refletir a formação de EROs em células do músculo esquelético submetidas a contrações.

Com relação aos demais métodos anteriormente citados, suas análises têm sido feitas em amostras de sangue ou de músculo na forma de homogenato, coletadas após o exercício. Assim, essas

análises podem não ser representativas da real ocorrência de ataque oxidativo, uma vez que o consumo de oxigênio e a produção de EROs diminuem rapidamente após 1 a 2 minutos do término do exercício (36), permanecendo a verdadeira taxa de formação de EROs pelas células musculares desconhecida. Em adição, deve-se levar em conta que o tempo de vida dos radicais livres é extremamente curto e, ainda, a presença do sistema antioxidante como competidor, muitas vezes difícil de eliminar. Outro problema é que, em homogenato de tecido muscular, bem como em músculo isolado, o sistema vascular pode estar presente em grande escala, dificultando a interpretação dos resultados. De modo similar, amostras sanguíneas podem não ser adequadas para muitas situações experimentais (37,38). Atualmente, tem sido mostrado que amostras de sangue podem não refletir informações detalhadas sobre as respostas celulares, sendo, então, as medidas sanguíneas em muitos casos irrelevantes. A razão para essas discrepâncias pode estar nas diferentes características cinéticas apresentadas pelos compartimentos sanguíneo e intersticial para um mesmo composto quando comparadas (37). As EROs, como já bem estabelecido na literatura, possuem um tempo de vida extremamente curto e uma alta reatividade. Portanto, parece difícil acreditar que essas espécies possam escapar do sistema antioxidante, alcançando a circulação sistêmica, e posteriormente sejam detectadas neste compartimento. Em um recente artigo de revisão, Jenkins (30) chamou a atenção em destacar um fato ocorrido em um determinado laboratório onde os pesquisadores locais, após um experimento na tentativa de detectar H_2O_2 , exclamaram: “Processamos um animal inteiro e não encontramos uma ‘gota’ sequer de H_2O_2 ”! Na verdade, é importante destacar que o problema não estava no método de detecção utilizado, mas sim na capacidade de perceber a rápida eliminação do H_2O_2 nos tecidos, bem como na adequação do método à situação experimental. Com base nos problemas discutidos acima, podemos, de forma simples, perceber que a determinação da produção de EROs pelas células musculares durante o exercício realmente não é uma tarefa muito fácil. Isso, então, implica que um cuidado especial deve sempre ser tomado antes de decidir o método experimental utilizado e, principalmente, o tipo de amostra a ser analisado. Em adição, podemos, ainda, assumir que certos tipos de amostras, como homogenato de tecido muscular e sangue, parecem definitivamente não ser representativos da produção de EROs pelas células

musculares durante o exercício.

Evidências “Diretas” da Formação de EROs e ERN Durante o Exercício em Células Musculares

Atualmente, a regulação dos níveis de EROs tem sido considerada fundamental para o estabelecimento do balanço redox na maioria dos tecidos em nosso organismo, incluindo o tecido muscular esquelético, durante o estado basal de repouso e durante o exercício, onde o consumo de O_2 é muitas vezes aumentado.

Apesar do sofisticado sistema de defesa antioxidante, existe, atualmente, uma série de resultados mostrando a possibilidade de ocorrência de estresse oxidativo em células de músculos esqueléticos durante o exercício. Em um estudo original, Davies e cols. (39), usando a técnica de ressonância paramagnética de elétrons (EPR), mostraram pela primeira vez a formação de EROs em homogenato de músculo de rato previamente submetido a uma sessão de exercício agudo extenuante. Porém, estes autores foram incapazes de identificar as EROs produzidas durante o processo de contração muscular. Reid e cols. (40), usando o citocromo c como detector do $O_2^{\cdot-}$, verificou um aumento do efluxo dessa espécie para o meio extracelular em músculo do diafragma de rato eletricamente estimulado. A especificidade do método ao $O_2^{\cdot-}$ foi demonstrada pela adição de SOD. Em outro estudo, O'Neill e cols. (36), usando a hidroxilação intravenosa da fenilalanina, demonstraram que o $\cdot OH$ é produzido *in vivo* durante contrações do músculo esquelético. Sem dúvidas, esses resultados proporcionam evidências “diretas” para geração intracelular das EROs. Porém, é importante observar que, nas condições em que esses experimentos foram realizados, isto é, utilizando músculo esquelético isolado, homogenato de tecido muscular ou modelo *in vivo*, o tecido vascular, um conhecido sítio de formação de EROs, não foi completamente eliminado, dificultando a interpretação dos resultados. Portanto, nas condições citadas acima, a determinação de EROs pode não ser representativa da real taxa de EROs produzida pelas células musculares *in vivo*.

Em adição, nos últimos anos houve, ainda, uma grande expansão nas investigações sobre a produção de NO em células musculares. Esse interesse deve-se, principalmente, aos importantes papéis do NO em vários processos fisiológicos no tecido muscular, incluindo regulação metabólica, regulação do fluxo sanguíneo, angiogênese, expressão gênica e modulação no processo de contração muscular (10,11). Apesar de sua importância fisiológica, a excessiva produção do NO pelas células musculares durante o exercício pode exercer diferentes efeitos modulatórios no processo de

contratilidade. Estudos utilizando músculos diafragma isolados mostram que a força de contratilidade durante contrações submáximas foi aumentada com a inibição da NOS. Por outro lado, o efeito oposto, com diminuição da força submáxima, foi verificado com a adição de doadores de NO (9,41). Embora o mecanismo exato permaneça desconhecido, alguns investigadores sugerem que o NO exerce seus efeitos inibindo diretamente a interação entre o Ca^{++} e os miofilamentos contráteis (42), ou afetando o padrão de deslizamento dos miofilamentos, reduzindo a velocidade máxima de encurtamento e diminuindo a atividade da ATPase (12). O NO pode, ainda, exercer seus múltiplos efeitos indiretamente, diminuindo a produção de energia via redução da respiração mitocondrial, inibindo a atividade da citocromo oxidase (43). Seus efeitos indiretos podem, ainda, causar inibição das enzimas citosólicas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e creatina quinase (44,45). Em adição, tem sido mostrado que o NO pode interagir com $O_2^{\cdot-}$ formando $\cdot ONOO$, uma potente espécie oxidante, capaz de causar dano oxidativo em diversos compostos intracelulares (46). Em conjunto, esses resultados indicam que o NO exerce um potente efeito inibidor no processo de contração do músculo esquelético. No entanto, pouco ainda se conhece a respeito da regulação da produção de NO em células musculares, pois grande parte das evidências existentes são “indiretas” via aumento da atividade da NOS (9,47), ou pela utilização direta de doadores de NO (9,38). Por outro lado, uma limitada quantidade de estudos tem proporcionado evidências “diretas” da formação de NO em células musculares. Balon & Nadler (48), usando um método de quimioluminescência, encontrou um significativo aumento na produção de NO após estímulo elétrico *in situ* comparado com o controle não estimulado. Porém, as células endoteliais presentes no tecido vascular têm uma grande quantidade de NOS, tornando difícil a interpretação de que o NO fora produzido somente pelas células musculares. Em outro estudo, Tidball e cols. (49), usando um método espectrofotométrico, verificaram um aumento de 42% na produção de NO em culturas de células musculares estimuladas por pressão. Apesar da detecção dos aumentos significativos na produção de NO, os autores neste estudo não removeram o sinal do marcador de NO utilizado, tornando incerta a especificidade do método. Portanto, por causa das limitações metodológicas, os estudos acima ainda proporcionam poucas evidências de que o NO seja produzido pelo músculo esquelético durante contrações. Apesar do grande número de estudos, pouco ainda se conhece a respeito da formação do NO em células musculares. Então, devido à grande implicação fisiológica do NO em células musculares, seria

fundamental o estabelecimento de um método capaz de medir a formação de NO nesse tipo de células.

Recentemente, mostramos, *in vitro*, utilizando cultura primária de células musculares, a produção de EROs e NO durante contrações intensas utilizando sondas fluorescentes. A vantagem desse modelo sobre os demais está no fato de não possuir qualquer outro tipo de tecido capaz de gerar EROs ou ERNs. Portanto, nos parece claro que o sinal obtido durante as contrações é exclusivo do tecido muscular, não deixando qualquer dúvida da produção dessas espécies em músculo esquelético (figuras 3 e 4).

Utilização de Sondas Fluorescentes como Métodos Alternativos para Detecção de EROs e ERN em Células Musculares

O estabelecimento de um método sensível na detecção de EROs e ERN tem sido fundamental devido ao amplo papel fisiológico e deletério dessas espécies no tecido muscular. Devido a todas as dificuldades existentes na determinação de EROs e ERN como discutido previamente, nos últimos anos muitos estudos têm surgido apresentando métodos cada vez mais atrativos para a determinação de EROs. Devido a uma maior sensibilidade, os métodos fluorescentes têm sido extremamente utilizados para monitorar a produção de EROs e ERNs em células de diferentes tecidos (29,50-52). Conhecidas como 2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (reativo ao H_2O_2) e 4,5-

Diaminofluoresceína diacetato (DAF-2-DA) (reativo ao NO), apresentam uma grande vantagem em relação aos métodos anteriormente descritos, podendo ser usadas como marcadores oxidativos tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Por ser o grupo diacetato apolar, essas sondas difundem-se facilmente através da membrana celular em diferentes tecidos. Dentro das células, o grupo diacetato é facilmente hidrolizado por esterasas citosólicas, deixando livres as moléculas de DCFH e DAF-2. Por serem, agora, polares, essas moléculas proporcionam um excelente substrato ao H_2O_2 e ao NO gerados em excesso durante aumento do metabolismo oxidativo (figura 5). Outra grande vantagem desses métodos está na sua alta sensibilidade de detecção dessas espécies, permitindo a análise quantitativa dessas espécies na ordem de picomolar, como normalmente é esperado em condições fisiológicas (52,53). Porém, apesar de sua popularidade, a especificidade do DCFH ainda é bastante discutida na literatura. Resultados divergentes têm sido apresentados quando experimentos usando o DCFH como marcador oxidativo em meio livre de células são comparados com experimentos em meio na presença de células (51,54,55). Portanto, embora um certo cuidado deva ser tomado, nossos resultados apresentados na figura 4 estão de acordo com os resultados originais de LeBel e cols. (56), mostrando uma maior especificidade do DCFH ao H_2O_2 . Em adição, resultados *in vitro* mostraram

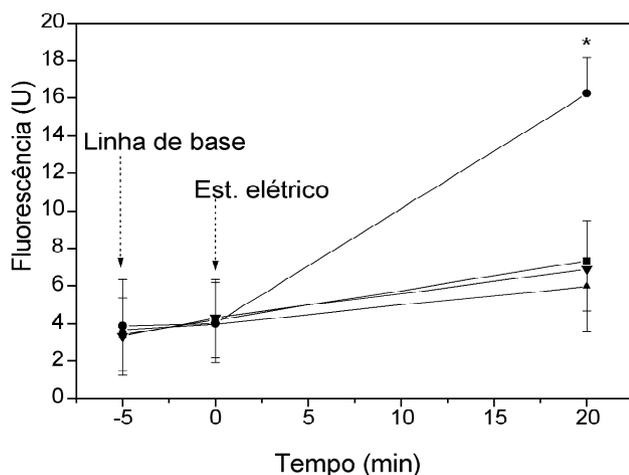


Figura 3. Oxidação intracelular do DCFH em cultura primária de células musculares não-estimuladas (controle s, n= 10), durante contrações moderadas (n, n= 8), contrações intensas (l, n= 10) e contrações intensas + GSH (0,5mM) (t, n= 10). * P< 0,001 comparado aos demais grupos. GSH= glutationa reduzida. (Modificado de (35)).

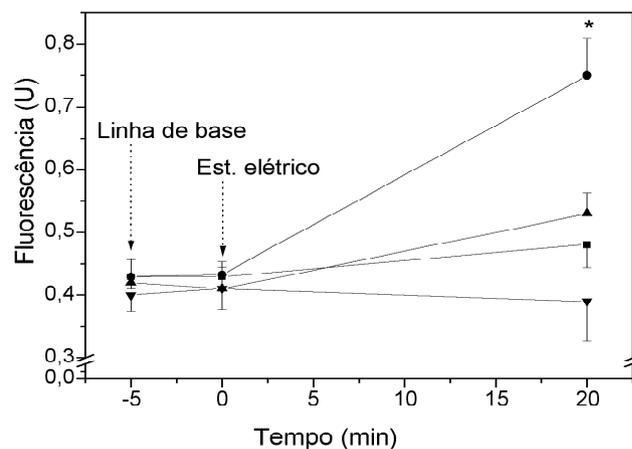


Figura 4. Oxidação intracelular do DAF-2 em cultura primária de células musculares não-estimuladas (controle n, n= 10), durante contrações moderadas (s, n= 8), contrações intensas (l, n= 10) e contrações intensas + LNA (300µM) (t, n= 10). * P< 0,001 comparado aos demais grupos. LNA= N-nito-L-arginina. (Modificado de (35)).

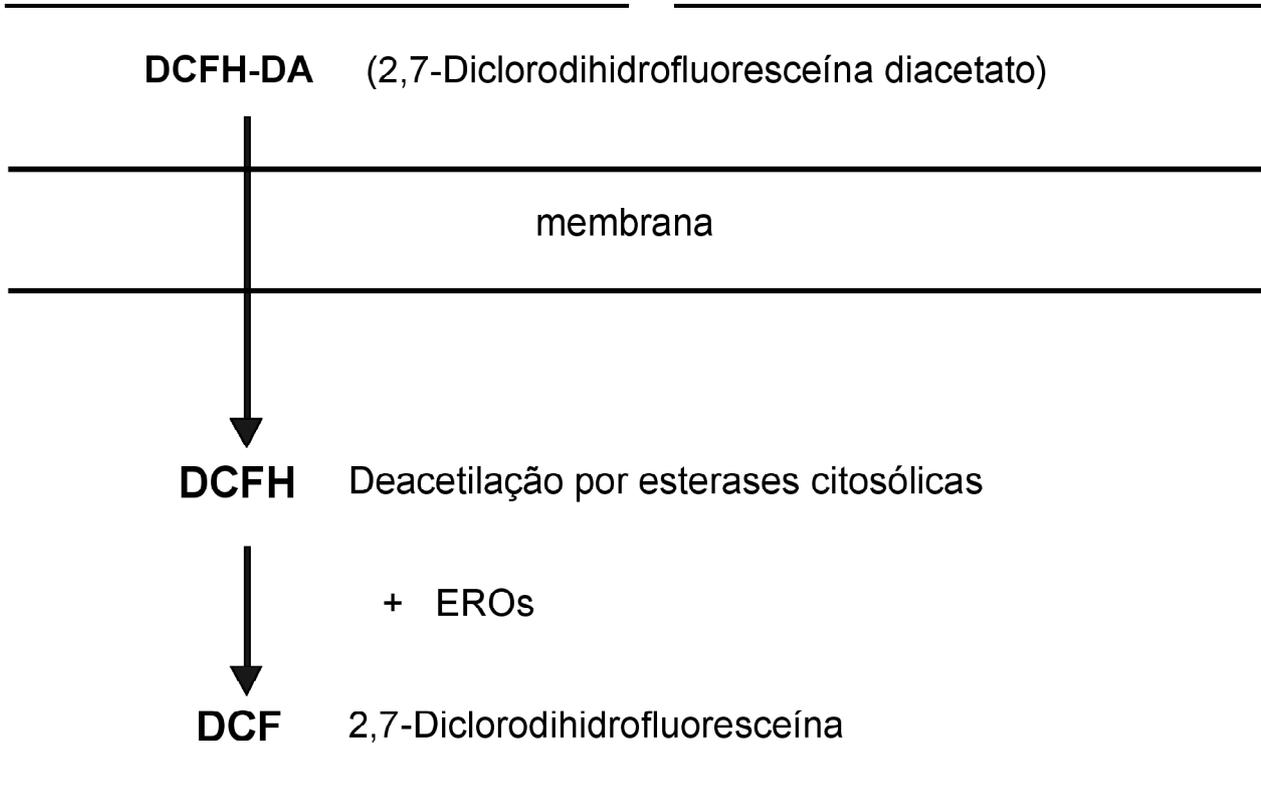


Figura 5. Princípio do mecanismo de funcionamento do DCFH-DA para determinação de EROs no meio intracelular de células musculares durante atividade. DCFH-DA difunde-se para dentro das células, e no citosol é deacetilado por esterasas, tornando disponível para reação com as EROs formadas no meio intracelular. Adaptado de LeBel e cols. 1992.

uma baixa especificidade do DCFH às demais espécies, como $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ e NO (35).

Outra sonda fluorescente ainda pouco explorada na determinação de EROs em células musculares é o Proxil Fluorescamina (fluoróforo-nitróxido), um composto polar capaz de se reduzir à sua correspondente hidroxilamina ao reagir com o superóxido ou com o radical hidroxila na presença de agentes redutores. Este composto, portanto, tem sido apresentado na literatura como uma específica e atraente sonda para detecção extracelular do radical superóxido (57). O nitróxido foi inicialmente utilizado em neutrófilos durante *burst* oxidativo e recentemente utilizado com grande sucesso em nosso laboratório na determinação extracelular do radical superóxido em células musculares durante contrações (35). Portanto, a fácil manipulação dessas sondas no meio intra e extracelular faz delas um excelente modelo experimental na detecção intra e extracelular de EROs e ERN em células do tecido muscular esquelético durante contrações.

Papel Fisiológico das EROs e ERNs em Músculo Esquelético Durante Contrações

Observações recentes mostrando que a atividade

muscular intensa aumenta a produção de EROs/ERNs (58-60) têm conduzido muitos investigadores a estudar o efeito dessas espécies nos processos moleculares de contração-excitação do músculo esquelético durante contrações. Estes processos incluem a despolarização de membrana, ativação dos receptores de hidropiridina e reanodina, aumento do efluxo de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático (RS), recaptação do Ca^{++} citosólico via Ca^{++} -ATPase e atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase, os quais podem, direta ou indiretamente, ser afetados pelas EROs/ERNs (6,61).

Favero e cols. (62) mostraram que H_2O_2 atua como um oxidante, induzindo a liberação de Ca^{++} em vesículas isoladas do RS via reanodina, e que essa liberação foi afetada pelas EROs em um modelo dose-dependente. Em concentrações fisiológicas de H_2O_2 , o receptor foi ativado aumentando o efluxo de Ca^{++} , ao passo que, em concentrações elevadas, o receptor foi inibido reduzindo a permeabilidade ao Ca^{++} . Em fibra isolada de rã, foi verificado que o H_2O_2 tem um efeito bifásico na força de contração. Inicialmente, com a breve exposição ao H_2O_2 , a força de

contração aumenta, ao passo que, com a longa exposição à força de contração, diminui significativamente (63). Extrapolando para uma situação real *in vivo*, entre outras fontes já bem estabelecidas, isso poderia ajudar a explicar o desenvolvimento de fadiga durante o exercício prolongado. Em um estudo semelhante, Reid e cols. (64) demonstraram em fibra muscular isolada de rato que uma breve exposição da fibra muscular a baixas concentrações de H_2O_2 aumentou a força de contração. Em contraste, a utilização da CAT como antioxidante teve o efeito oposto, reduzindo substancialmente os níveis de força.

Juntos, os resultados descritos acima demonstram a necessidade de uma certa produção de EROs intramuscular para um melhor desenvolvimento de força durante atividade muscular. Porém, em quantidades elevadas de EROs, o efeito oposto, reduzindo a performance, é sempre esperado (6). Outros possíveis alvos das EROs/ERNs incluem grupos tióis da molécula de miosina, resíduos de cisteína presentes no complexo troponina, Ca^{++} -ATPase e, ainda, o potencial de ação na membrana celular (62). Portanto, esses achados demonstram claramente a importância do balanço redox intracelular para os processos fisiológicos responsáveis pelas funções contráteis do músculo esquelético.

O NO também exerce um potente efeito modulador no processo de contração do músculo esquelético. Em diafragma isolado, foi demonstrado que a força de contração submáxima aumentou com a utilização de inibidores da NOS e da hemoglobina como seqüestrador do NO. Ao contrário, a força submáxima foi diminuída com a utilização de doadores de NO (9,11). O NO exerce esse papel via diferentes mecanismos, incluindo o GMPc-dependente e GMPc-independente (9,65). Embora os princípios do mecanismo GMPc-dependente sejam ainda desconhecidos, a força de contração muscular é sempre reduzida por intervenções que aumentam a concentração de GMPc via aumento da produção de NO; isto é, utilizando doadores de NO, GMPc análogos e inibidores da fosfodiesterase. Em contraste, a força de contração aumenta por intervenções que diminuem as concentrações de GMPc; isto é, utilizando inibidores da NOS e da guanilato ciclase (42,65).

No mecanismo GMPc-independente, o NO diretamente induz modificações em resíduos de proteína no RS. Em baixas concentrações, o NO protege o canal contra oxidações induzidas pelo H_2O_2 . Porém, em altas concentrações, o papel do NO

assemelha-se àquele do H_2O_2 , ou seja, reduzindo a força de contração (42).

CONCLUSÕES

A revisão dos artigos utilizados no presente estudo nos permite concluir que:

1) As medidas “indiretas” de ataque oxidativo em amostras sanguíneas não necessariamente refletem o ataque oxidativo ocorrido nas células musculares durante contrações.

2) Amostras de tecido muscular como músculos isolados e homogenatos podem apresentar uma grande quantidade de tecido vascular contendo células endoteliais, hemácias e leucócitos. A presença desses diferentes tecidos, também capazes de gerar EROs ou NO, pode dificultar a interpretação final de que as células musculares são importantes fontes geradoras dessas espécies durante o exercício.

3) As sondas fluorescentes DCFH-DA/DCFH, DAF-2-DA/DAF-2 e nitróxido são altamente sensíveis na detecção do H_2O_2 , NO e O_2^- , respectivamente, em tecido muscular durante contrações.

4) Como método alternativo no estudo da regulação e produção de EROs e ERN em músculo esquelético, culturas de células musculares e fibra muscular isolada são indicados como modelos no estudo da geração dessas espécies devido à quantidade negligenciável do tecido vascular presente nestes modelos.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao CAPES pelo suporte financeiro, e à Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva do Instituto de Biologia – Depto de Bioquímica – UNICAMP, pela importante contribuição na revisão final deste manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proc Soc Exper Biol Med** 1999;222:283-92.
2. Meneghini R. A toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje** 1987;5(28):57-62.
3. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev** 1979;59(3):527-605.
4. McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. **J Biol Chem** 1968;243:5753-60.

5. McCord JM. Free radicals and inflammation: protection of sinovial fluid by superoxide dismutase. **Science** **1974**;185:529-30.
6. Andrade FH, Reid MB, Allen DG, Westerblad H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. **J Physiol** **1998**;509(2):565-75.
7. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS. Reactive oxygen in skeletal muscle I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue *in vitro*. **J Appl Physiol** **1992**;73(5):1797-804.
8. Schreck R, Albermann KAJ, Baeuerle PA. Nuclear factor κ B: a oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). **Free Rad Res Comm** **1992**;17:221-37.
9. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature** **1994**;372:546-8.
10. Bredt D. Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. **Free Rad Res** **1999**;31:577-96.
11. Reid MB. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. **Med Sci Sports Exerc** **2001**;33(3):371-6.
12. Galler S, Hilber K, Gobesberger A. Effects of nitric oxide on force-generating proteins of skeletal muscle. **Pflugers Arch** **1997**;434:242-5.
13. Alessio HM, Goldfarb AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. **J Appl Physiol** **1988**;64(4):1333-6.
14. Clanton TL, Zuo LI, Klawitter P. Oxidants and skeletal muscle function: Physiologic and pathophysiologic implications. **Proc Soc Exper Biol Med** **1999**;222:253-62.
15. Andrade FH, Reid MB, Westerblad H. Contractile response of skeletal muscle to low peroxide concentrations: myofibrillar calcium sensitivity as a likely target for redox-modulation. **Faseb J** **2001**;15:309-11.
16. Meydani M, Evans WJ. Free radicals, exercise, and aging. In: Yu, BP, Ed. **Free Radical in Aging**. Boca Raton, **1993**. p.183-204.
17. Gohil K, Viguie C, Stanley WC, Brooks GA, Packer L. Blood glutathione oxidation during human exercise. **J Appl Physiol** **1988**;64(1):115-9.
18. Ernster L. Oxygen as an environmental poison. **Chem Scripta** **1986**;26:525-34.
19. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev** **1994**;74:139-61.
20. Halliwell B, Gutteridge JMC. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, eds. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, **1989**. p. 136-58.
21. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. **Methods Enzymol** **1990**;186:1-85.
22. Haber F, Weiss JJ. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proc Royal Soc London** **1934**;147:332-51.
23. Pyne DB. Regulation of neutrophil function during exercise. **Sports Med** **1994**;17:245-58.
24. Downey JM. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia-reperfusion. **Ann Rev Physiol** **1990**;52:487-504.
25. Kuehl FAJ, Egan RW. Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. **Science** **1980**;210:978-84.
26. Rao KMK, Padmanabhan J, Kilby DL, Cohen HJ, Currie MS, Weinberg JB. Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. **J Leuk Biol** **1992**;51:496-500.
27. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H. Oxidation of 2',7'-Dichlorofluorescein by peroxynitrite. **Free Rad Res Comm** **1997**;27(3):245-54.
28. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro* Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. **Nitric Oxide** **1997**;1:145-57.
29. Kehrer JP, Paraidathathu T. The use of fluorescent probes to assess oxidative processes in isolated-perfused rat heart tissue. **Free Rad Res Comm** **1992**;16(4):217-25.
30. Jenkins RR. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. **Am J Clin Nutr** **2000**;72:670S-4S.
31. Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, et al. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am J Physiol** **1994**;266:R375-80.
32. Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK, Korthuis RJ. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. **J Appl Physiol** **1990**;68(6):2337-43.
33. Leeuwenburgh C. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. **Am J Physiol** **1997**;272:R363-R9.
34. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyuprein (Hemocuprein). **J Biol Chem** **1969**;244(22):6049-55.
35. Silveira LR. **Determinação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico através de sondas fluorescentes *in vitro* utilizando culturas de células musculares e músculos isolados e sua aplicação *in vivo* com a técnica de microdialise**. Campinas, **2003**. (Tese de Doutorado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas).
36. O'Neill CA, Stebbins CL, Bonigut S, Halliwell B, Longhurst JC. Production of hydroxyl radicals in contraction skeletal muscle of cats. **J Appl Physiol** **1996**;81(3):1197-206.
37. Lonroth P. Microdialysis: a new and promising method in clinical medicine. **J Inter Med** **1991**;230:363-4.
38. Simonsen L, Bulow J, Madsen J. Adipose tissue metabolism in humans determined by vein catheterization and microdialysis techniques. **Am J Physiol** **1994**;266:E357-E65.
39. Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem Biophys Acta** **1982**;107:1198-205.
40. Reid MB, Shoji T, Moody MR, Entman ML. Reactive oxygen in skeletal muscle II. Extracellular release of free

- radical. **J Appl Physiol** **1992**;73:1805-9.
41. Andrade FH, Moody MR, Stamler JS, Reid MB. Cytochrome c reduction assay detects nitric oxide release by rat diaphragm. In: Moncada S, Stamler J, Gross S, Higgs E, eds. **The Biology of Nitric Oxide**. London: Portland Press, **1996**. p. 45.
42. Aghdasi B, Reid MB, Hamilton SL. Nitric oxide protects the skeletal muscle Ca²⁺ release channel from oxidation induced activation. **J Biol Chem** **1997**;272:25462-7.
43. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide: implications for neurodegenerative diseases. **FEBS Letters** **1994**;345:50-4.
44. Mohr S, Stamler JS, Brune B. Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. **J Biol Chem** **1996**;271:4209-14.
45. Gross WL, Bak MI, Ingwall JS. Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve. **Proc Natl Acad Sci** **1996**;93:5604-9.
46. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci** **1990**;87:1620-4.
47. Nakane M, Schmidt HHH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. **FEBS Letters** **1993**;316:175-80.
48. Balon TW, Nadler JL. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. **J Appl Physiol** **1994**;77(6):2519-21.
49. Tidball JG, Lavergne E, Lau KS, Spencer MJ, Stull JT, Wehling M. Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. **Am J Physiol** **1998**;275(44):C260-C6.
50. Burow S, Valet G. Flow-cytometric characterization of stimulation, free radical formation, peroxidase activity and phagocytosis of human granulocytes with 2,7-dichlorofluorescein (DCF). **Eur J Cell Biol** **1987**;43:128-33.
51. Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. **J Leuk Biol** **1994**;5:253-8.
52. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicator: Diaminofluoresceins. **Anal Chem** **1998**;70:2446-53.
53. Cathcart R, Schwiers E, Ames BN. Detection of picomoles levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. **Anal Biochem** **1983**;134:111-6.
54. Zhu H, Bannenberg GL, Moldeus P, Shertzer HG. Oxidation pathways for the intracellular probe 2'-7'-dichlorofluorescein. **Arch Toxicol** **1994**;68:582-7.
55. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. **J Immunol** **1983**;130(4):1910-7.
56. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy H. Evaluation of the probe 2'-7'-Dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem Res Toxicol** **1992**;5:227-31.
57. Pou S, Huang YI, Bhan A, Bharti VS, Hosmane RS, Wu SY, et al. A fluorophore-containing nitroxide as a probe to detect superoxide and hydroxyl radical generated by stimulated neutrophils. **Anal Biochem** **1993**;212:85-90.
58. Bailey DM, Davies B, Young IS, Jackson MJ, Davison GW, Isaacson R, et al. EPR spectroscopic detection of free radical outflow from an isolated muscle bed in exercise in humans. **J Appl Physiol** **2003**;94:1714-8.
59. Ortenblad N, Young JF, Oksbjerg N, Nielsen JH, Lambert IH. Reactive oxygen species are important mediators of taurine release from skeletal muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol** **2003**;284:C1362-73.
60. Silveira LR, Pereira da Silva L, Juel C, Hellsten Y. Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. **Free Rad Biol Med** **2003**;35(5):445-64.
61. Supinski G. Free radical induced respiratory muscle dysfunction. **Mol Cell Biochem** **1998**;179:99-110.
62. Favero TG, Zable AC, Bowman MB, Thompson A, Abramson JJ. Metabolic and products inhibit sarcoplasmic reticulum Ca⁺⁺ release and (³H)ryanodine binding. **J Appl Physiol** **1995**;78:1665-72.
63. Oba T, Koshita M, Yamaguchi M. H₂O₂ modulates twitch tension and increases P₀ of Ca²⁺ release channel in frog skeletal muscle. **Am J Physiol** **1996**;271:C810-8.
64. Reid MB, Khawli FA, Mood MR. Reactive oxygen in skeletal muscle III. Contractility of unfatigued muscle. **J Appl Physiol** **1993**;75:1081-7.
65. Abraham RZ, Kobzik L, Moody MR, Reid MB, Stamler JS. Cyclic GMP is a second messenger by which nitric oxide inhibits diaphragm contraction. **Comp Biochem Physiol** **1998**;119A:177-83.

Endereço para correspondência:

Leonardo R. Silveira
Depto. de Fisiologia - IB, UNICAMP
Cidade Universitária Zeferino Vaz s/nº
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP
Fax: (19) 3788-6129
E-mail: lrs@fisio.icb.usp.br