

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

**EFEITO PROTETOR DA COENZINA Q10 SOBRE OS DANOS OXIDATIVOS DA L-
TIROXINA NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS**

Fabiana Barreiro de Freitas Silva

Fisioterapeuta

ARAÇATUBA - SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

**EFEITO PROTETOR DA COENZIMA Q10 SOBRE OS DANOS OXIDATIVOS DA L-
TIROXINA NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS**

Fabiana Barreiro de Freitas Silva

Orientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP - Campus de Araçatuba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA - SP

2014

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Fabiana Barreiro de Freitas Silva- nascida em Andradina (SP) no dia 28 de fevereiro de 1981, ingressou no curso de bacharelado em Fisioterapia pelo Unisalesiano - Campus de Araçatuba (SP) em fevereiro de 2004, obtendo o título de fisioterapeuta em julho de 2010. Em novembro de 2009, ingressou na pós-graduação em Saúde Pública e Saúde da Família No Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium em Araçatuba, onde em dezembro de 2011 obteve o título de especialista em Saúde Pública. Ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal pela UNESP, Campus de Araçatuba (SP), em agosto de 2012 na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica sob orientação do Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto, responsável pelas disciplinas de Bioquímica Animal e Química Geral do curso de graduação em Zootecnia da UNESP, Campus de Dracena. Concluiu o mestrado em julho de 2014.

*Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.*

*Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos
para executar seus sonhos.
Melhor é errar por tentar do que errar por omitir!”*

Augusto Cury

DEDICO:

Aos meus pais, que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos desde o meu primeiro dia de aula na pré escola. Dedico especialmente este trabalho ao meu exemplo de vida acadêmica, Dr. Fábio Erminio Mingatto, que sempre me estimulou dar este grande passo.

Meus pais e meu orientador são pessoas com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação e sempre estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Com toda certeza, sem o apoio e inspiração de vocês, esse trabalho não aconteceria..

Agradeço sempre a Deus por ter colocado vocês em minha vida.

Agradecimentos

Agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação não é tarefa fácil. O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Então, aos meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Então é melhor começar do início. Meu maior agradecimento é dirigido aos meus pais, por terem sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Agradeço minha mãe, principalmente pela sua paciência infinita e sua crença absoluta na capacidade de realização a mim atribuída foram, indubitavelmente, os elementos propulsores desta dissertação e a meu pai por sempre acreditar em mim. Professor Fábio Erminio Mingatto, meu companheiro, soube compreender perfeitamente a minha trajetória na realização deste trabalho, sempre tentando entender minhas dificuldades e minhas ausências, procurando sempre manter contato por e-mails e telefonemas. Obrigada, muito obrigada, por ser um orientador dedicado e atencioso.

Minha esperança é que, compensando o tempo e esforço despendidos, algumas das idéias apresentadas aqui venham por ajudar a mim e a identificar maneiras adicionais de enriquecer suas vidas e contribuir com outras pesquisas.

Minha seleção, no âmbito acadêmico, deve também começar do início. Além do agradecimento acima, feito ao professor Fábio Mingatto, tenho que agradecer-lo por ter aceito a orientação de minha dissertação, na esperança de retribuir, com a seriedade de meu trabalho, a confiança em mim depositada.

Incluo, de forma especial, os nomes, Hyllana Catarina Dias de Medeiros, Marieli Guelfi e Andréia Tieme nesta minha lista seletiva. Foi sorte ter elas no meu caminho acadêmico nesta etapa de conclusão de mestrado. Nunca me esquecerei

de quando cuidaram dos animais para mim, da moradia oferecida e de todo ensino que me foi concedido. . Hyllana , Marieli e Andréia agradeço pela paciência e pela ajuda nos experimentos. Sem vocês não conseguiria nada.

Não posso esquecer também das amigas de que sempre me apoiaram e me ajudaram nesse sonho Priscila Rodrigues, sem você eu não teria entrado no Mestrado, Jamila Baptistela por me deixar um tempo para me ensinar a tirar o músculo sóleo e o professor Mário Jefferson Quirino Louzada, por permitir que o fizesse em seu laboratório. Também agradeço imensamente a Unesp, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, FMVA por seu suporte em tudo e a Capes pela Bolsa de Estudos, o que me permitiu estudar e viajar para fazer os meus experimentos em Dracena.

Agradeço principalmente aos meus amigos e familiares por todo apoio nas minhas ausências nas festas ou comemorações pois estava estudando e por entenderem que sem sacrifício não se chega a lugar nenhum.

Sumário	Página
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Hipótese.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Músculo.....	19
2.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio	20
2.2.2 Sistema de Defesa Antioxidante	23
2.2.3 Prevenção da Formação de Ero	23
2.2.4 Danos oxidativos causados pelas Eros	25
2.2.5 Coenzima Q10.....	27
2.2.6 L-Tiroxina.....	28
2.2.7 Exercício Físico e Estresse Oxidativo	28
3 OBJETIVO.....	29
4 Material e Método	30
4.1 .Reagentes.....	30
4.2 Avaliação Ética.....	30
4.3 Animais e Tratamento	30
4.4 Análises Bioquímicas	31
4.5 Análise das enzimas séricas indicadoras de lesões	

musculares.....	31
4.6 Preparação do homogenato do músculo sóleo.....	31
4.7 Atividade da Enzima Glutathione Peroxidase (GPx).....	32
4.8 Atividade da enzima Glutathione Redutase	32
4.9 Determinação da concentração de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)	32
4.10 Avaliação da Peroxidação de lipídeos de membrana	34
5 RESULTADOS.....	34
4.11 Análise estatística.....	34
5 Resultados.....	34
5.1 Análise da atividade sérica das enzimas creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase	35
5.2 Análise da atividade das enzimas Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Redutase (GR) no Homogenato do Músculo sóleo.....	36
5.3 Concentração de Glutathione Reduzida (GSH) e Glutathione Oxidada (GSSG) no homogenato do músculo Sóleo	37
5.4 Oxidação dos Lipídeos de Membrana no homogenato de músculo sóleo	38
6 DISCUSSÃO.....	39
7 CONCLUSÃO.....	41
8 REFERÊNCIAS.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL=	Microlitro
μM=	Micromolar
CK=	Creatina Quinase
AST=	Aspartato transaminase
BSA=	Albumina de soro bovino
$\text{CCl}_3\cdot$=	Radical livre triclorometil
CEEA=	Comissão de Ética em Experimentação Animal
Cit. P450=	Citocromo P450
$\text{Cl}\cdot$=	Radical cloro
Cu^{++}=	Íon cobre
CYP2E1=	Isoforma do citocromo P-450 2E1
CYP3EA=	Isoforma do citocromo P-450 3EA
CYP-450=	Citocromo P-450
Ck=	Creatina Quinase
DMSO=	Dimetilsulfóxido

e⁻	Elétron
EGTA=	Acido etilenoglicol bis-(β-aminoetil éter) N, N, N', N' tetracético
EPM=	Erro padrão da média
ERRO=	Espécie reativa de oxigênio
FADH₂=	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FCCP=	Carbonilcianeto-p-trifluormetoxifenilhidrazona
Fe⁺⁺=	Íon ferro
SDS=	Dodecil sulfato de sódio
TBARS=	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
GPx=	Glutathione peroxidase
GR=	Glutathione reductase
GSH=	Glutathione reduzida
H⁺=	Íon hidrogênio
H₂O₂=	Peróxido de hidrogênio
HEPES=	Ácido 2 [4(2 hidroxietil) piperazinil(1)] etanossulfônico
Kg=	Quilograma
KOH=	Hidróxido de potássio
LOO[•]=	Radical peroxila
L[•]=	Radical lipídico
LDL=	Lipoproteína de baixa densidade
LO[•]=	Radical alcóxila
nM	Nanomolar

LOOL	Lipídio oxidado
mM=	Milimolar
MDA=	Malonaldeído
NADPH=	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
O=	Oxigênio
OPT=	o-ftalaldeído
O₂=	Oxigênio molecular
S=	Segundos
O₂^{•-}	Radical superóxido
OH[•]	Radical hidroxila
pH=	Potencial hidrogeniônico
SOD =	Superóxido dismutase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Espécies Reativas.....	20
Figura 2-	Reação de Fenton.....	21
Figura 3-	Ação da Enzima Catalase	24
Figura 4-	Sistema Antioxidante Enzimático.....	25
Figura 5-	Etapas da peroxidação.....	26
Figura 6-	Análise das enzimas AST e CK	35
Figura 7-	Análise da GPx e GR	36
Figura 8-	Concentração de GSH e GSSG.....	38
Figura 9-	Oxidação dos Lipídeos de Membrana.....	35

EFEITO PROTETOR DA COENZIMA Q10 SOBRE OS DANOS OXIDATIVOS DA L-TIROXINA NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS

RESUMO: Os músculos esqueléticos são tecidos dinâmicos que podem alterar suas características fenotípicas proporcionando melhor adaptação funcional com estímulos variados. A habilidade de adaptação do tecido muscular durante o crescimento e exercício é dependente de mudanças qualitativas e quantitativas na expressão induzida pelos diversos estímulos. A L-tiroxina é um hormônio produzido pela glândula tireoide e tem sido utilizada como modelo experimental para estimulação de estresse oxidativo no músculo esquelético. A Coenzima Q10 (CoQ10) é uma provitamina lipossolúvel sintetizada endogenamente e naturalmente encontrada em alimentos como a carne vermelha, peixes, cereais, brócolis e espinafre. Apresenta propriedade antioxidante e potencial no tratamento de doenças degenerativas e neuromusculares. No presente trabalho foi avaliado o efeito protetor da CoQ10 no músculo sóleo frente aos danos provocados pela L- tiroxina. Os ratos foram distribuídos em quatro Grupos de seis animais cada: Grupo 1 (G1, controle); Grupo 2 (G2, coenzima Q10); Grupo 3 (G3, L-tiroxina) e Grupo 4 (G4, coenzima Q10 e L-tiroxina). Após a eutanásia, o sangue dos animais foi colhido e foi analisada a atividade sérica das enzimas creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST). No homogenato do músculo sóleo foram avaliados fatores relacionados ao estresse oxidativo. A CoQ10 protegeu o músculo sóleo e favoreceu a manutenção da atividade das enzimas antioxidantes glutathione redutase e glutathione peroxidase, da concentração de glutathione reduzida e oxidada, além de evitar a lipoperoxidação. Os resultados indicam que a CoQ10 protege o músculo sóleo de ratos dos danos oxidativos provocados pela L-tiroxina.

Palavras-chave: antioxidantes músculo esquelético, tiroxina ubiquinona, ,

PROTECTIVE EFFECT OF COENZYME Q10 ON OXIDATIVE DAMAGE OF L-THYROXINE IN RAT SOLEUS MUSCLE

ABSTRACT: Skeletal muscles are dynamic tissues that can alter their phenotypic characteristics providing better functional adaptation to different stimulus. The ability to adapt the muscle tissue during growth and exercise is dependent on qualitative and quantitative changes in expression induced by various stimuli. L-thyroxine is a hormone produced by the thyroid gland and has been used as an experimental model for stimulation of oxidative stress in skeletal muscle. CoQ10 is a fat-soluble provitamin endogenously synthesized and naturally found in foods like red meat, fish, grains, broccoli and spinach. Features antioxidant properties and potential in the treatment of degenerative diseases and neuromuscular diseases. The present study evaluated the protective effect of CoQ10 in the soleus muscle against damage caused by L-thyroxine. The rats were divided into four groups of six animals each: Group 1 (G1, Control); Group 2 (G2, coenzyme Q10); Group 3 (G3, L-thyroxine) and Group 4 (G4, coenzyme Q10 and L-thyroxine). After euthanasia, blood was collected and serum was analyzed activity of the enzymes creatine kinase (CK) and aspartate aminotransferase (AST). In the soleus muscle homogenate factors related to oxidative stress were evaluated. CoQ10 protected the soleus muscle and favored the maintenance of the antioxidant enzymes glutathione reductase and glutathione peroxidase, the concentration of reduced and oxidized glutathione, and prevent lipid peroxidation. The results indicate that CoQ10 protects rat soleus muscle from oxidative damage caused by L-thyroxine.

Keywords: , antioxidants skeletal muscle, , thyroxine ubiquinone

1 INTRODUÇÃO

Os músculos esqueléticos adultos são compostos de vários tipos de fibras, sendo caracterizados por diferenças quanto ao tipo de contração e classificados em dois grandes grupos, lento ou de contração lenta (tipo I) e rápido ou de contração rápida (tipo II) (LEFEUVRE et al.1996). Músculos posturais como, por exemplo, o sóleo, possuem maior proporção de fibras tipo I, oxidativas e resistentes à fadiga, enquanto os músculos envolvidos em atividades rápidas e que exigem força, como por exemplo, o bíceps braquial, possuem maior quantidade de fibras tipo II, altamente fadigáveis (GOLDSPINK, 2005).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas durante o metabolismo normal, por processos enzimáticos, e não enzimáticos, e, continuamente, causam danos oxidativos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos celulares (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1989). Para se protegerem contra a oxidação, os organismos contam com mecanismos químicos e enzimáticos (YU, 1994). O exercício físico é uma condição que exerce influência sobre o balanço entre ataque oxidativo e mecanismo de defesa antioxidante, condição conhecida como estresse oxidativo, uma vez que durante o exercício físico ocorrem várias reações químicas que implicam na formação de ERO (SEN et al., 2001)

A tiroxina (T4) é um hormônio produzido pela glândula tireoide que age no fígado, rim, coração, sistema nervoso e no músculo esquelético, sensibilizando esses tecidos à adrenalina e estimulando a respiração celular, o consumo de oxigênio e a taxa metabólica. A aceleração do metabolismo estimulada pela tiroxina provoca aumento na produção de calor. O que é de suma importância na termorregulação de muitos vertebrados (AIRES, 2008). A elevação do metabolismo basal e do consumo de oxigênio ocasionada pela alta produção de tiroxina, conhecida como hipertireoidismo, predispõe a célula a produzir espécies reativas de oxigênio (ASAYAMA et al., 1987), podendo ser utilizada como modelo experimental para estimulação de estresse oxidativo no músculo esquelético (SEYMEN et al., 2004;).

O exercício físico induz aumento de até 20 vezes no volume de oxigênio total consumido (VO_2) (ASTRAND; RODAHL, 1986). Assumindo que cerca de 2 a 5% do O_2 consumido dá origem a espécies reativas de oxigênio (ERO), esse aumento no consumo de oxigênio induzido pelo exercício físico está associado a um aumento na produção de tais espécies (JENKINS; GOLDFARB, 1993). A alta produção de ERO é responsável por várias ações deletérias, tais como aumento nos níveis de peroxidação de lipídios de membranas (ALESSIO, 1993), aumento na carbonilação de proteínas e até danos ao DNA intracelular (RADAK et al., 1999), o que em última instância altera e prejudica o metabolismo intracelular,

A Coenzima Q10 (CoQ10) possui várias funções bioquímicas nas células (CRANE, 2001), sendo a principal aquela exercida pela sua forma quinona, a qual transfere elétrons na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial dos complexos I e II para o complexo III, processo durante o qual prótons são bombeados para o espaço intermembranar gerando assim um gradiente eletroquímico transmembrana usado na fosforilação oxidativa (ERNSTER; DALLNER, 1995). A forma quinol da CoQ10 age como um potente antioxidante na membrana mitocondrial interna. Ela inibe a lipoperoxidação, ou por apresentar um efeito sequestrante de radicais livres, ou reduzindo o radical α -tocoferoxil a α -tocoferol (KAGAN et al., 1990; LASS; SOHAL, 1998). A CoQ10 tem sido utilizada como suplemento dietético e em conjunto com medicamentos em várias situações, incluindo doenças cardiovasculares, câncer, doenças neuromusculares degenerativas e diabetes (KUMAR et al., 2009; VILLALBA et al., 2010; EL-SHEIKH et al., 2012).

Portanto, neste trabalho foi avaliado o efeito protetor da Coenzima Q10 sobre o estresse oxidativo provocado no músculo sóleo de ratos pela L-tiroxina e os mecanismos envolvidos.

1.2 Hipótese

A Coenzima Q10 previne o estresse oxidativo induzido pela L-tiroxina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Músculo

Os músculos esqueléticos são tecidos dinâmicos que podem alterar suas características fenotípicas, proporcionando melhor adaptação funcional com estímulos variados (CAPITANIO et al., 2006). A habilidade de adaptação do tecido muscular durante o crescimento pós-natal e o exercício é dependente de mudanças qualitativas e quantitativas na expressão gênica induzida pelos diversos estímulos, e essa adaptação envolve seletivamente a indução ou repressão da expressão de subconjuntos de genes (GOLDSPINK, 1999; 2005). Estímulos mecânicos influenciam a expressão gênica no músculo e em outros tipos celulares, incluindo fibroblastose osteoblastos. A adaptação com relação à massa muscular é regulada tanto de forma local como sistêmica, entretanto, quando o músculo é exercitado, somente ele se torna hipertrófico e não todos os músculos do corpo.

O músculo sóleo tem sido utilizado para estudo das alterações oxidativas por predominarem, em sua constituição, as fibras tipo I (91%), sendo considerado um modelo sensível ao estresse oxidativo.(POLI FIQUEIREDO et al., 2005; BADHWAR et al., 2003)

A contração esquelética e cardíaca resulta da interação entre a actina e a miosina (ponte cruzada), de forma cíclica, na qual a energia química obtida a partir da hidrólise de ATP é convertida em trabalho mecânico, força e encurtamento. Os mecanismos da atividade ATPásica da miosina e actomiosina têm sido extensivamente estudados *in vitro* e *in situ* em fibras musculares esqueléticas.(EISEMBERG, 1981; CAMMARATO et al., 2008)

Dentre os importantes fatores determinantes das características fenotípicas musculares, encontram-se o tipo de inervação, atuação de hormônios, atividade contrátil (GOLDSPINK, 2006) e condição de alongamento (GUNNING; HARDEMAN, 1991).

Com o avanço cada vez maior das técnicas e conhecimentos nas áreas de biologia celular e tecidual, genética e saúde, grandes benefícios e facilidades são proporcionados ao estudo das adaptações e alterações musculares em treinamento físico, particularmente em relação à expressão de proteínas musculares, como a miosina, envolvidas na contração muscular e que garantem a especificidade desse processo. Esse aumento não se faz sentir apenas no músculo esquelético, sendo observável em muitos outros órgãos e tecidos. Uma das origens celulares dessa formação exagerada de Espécies Reativas de Oxigênio(ERO) durante a atividade física parece ser mitocondrial (ASCENSÃO et al., 2005; DI MEO; TONKONOGI; SAHLIN, 2002; VENDITTI, 2001).

2.2.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e estresse oxidativo

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo animal e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) (Figura 1). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS, 2006).

Espécies Reativas
Radicais Livres
Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's)
Superóxido ($O_2^{\bullet}$)
Hidroxila ($OH^{\bullet}$)
Hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$)
Peroxila ($RO_2^{\bullet}$)
Alcoxila ($RO^{\bullet}$)
Carbonato ($CO_3^{\bullet}$)
Dióxido de Carbono ($CO_2^{\bullet}$)

FIGURA 1- Classificação e nomenclatura das espécies reativas de oxigênio (BARREIROS, 2006)

Radical livre refere-se, portanto, a um átomo ou molécula altamente reativa que tenha um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica. As espécies não radicais são agentes oxidantes e podem se converter em radicais livres. Todo radical livre é uma espécie reativa, mas nem toda espécie reativa é um radical livre (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

As ERO podem ser derivadas de fontes exógenas ou produzidas endogenamente como consequência normal das funções celulares, por diversas enzimas que utilizam o oxigênio (O_2) como substrato (FINKEL; HOLBROOK, 2000; FINKEL, 2003) da excitação do O_2 para formar oxigênio singleto (1O_2) ou da redução do O_2 , nas mitocôndrias, pela citocromo oxidase (caa3) – que catalisa a transferência de um, dois e três elétrons – originando, respectivamente, radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) (ANTUNES NETO; PAULA, 2011).

As mitocôndrias são importantes fontes de $O_2^{\cdot-}$ e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas em superóxido dismutase (SOD) que o converte em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio isoladamente é praticamente inócuo, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares como, por ex., a membrana do núcleo. Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical $OH^{\cdot}$ em seu interior (reação de Fenton, Figura 2) (BARREIROS, 2006).

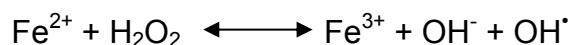


FIGURA 2- Reação de Fenton (BARREIROS, 2006).

O radical $\text{OH}^\bullet$ é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de H_2O_2 com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante e é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Este radical frequentemente ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações (BARREIROS, 2006).

Por serem extremamente reativas, níveis elevados ou sustentados de ERO podem causar danos graves ao DNA (deleções, mutações e translocações; além de oxidação de filamentos), às proteínas (modificações locais específicas nos aminoácidos, fragmentação da corrente do peptídeo e aumento da susceptibilidade da proteólise) e aos lipídios (alterações em propriedades de membranas biológicas) (ANTUNES NETO; PAULA, 2011).

A fim de minimizar os efeitos das ERO, organismos aeróbios desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante (FINKEL, 2003; SCANDALIOS, 2005). Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em concentrações mais baixas que a do substrato oxidável, é capaz de atrasar ou inibir significativamente a oxidação do mesmo (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1994). Para tanto, previnem a formação destas espécies; interceptam-nas assim que formadas; reparam o dano oxidativo ocasionado por elas; aumentam a eliminação das moléculas danificadas e aumentam a eliminação também das não excessivamente danificadas, para minimizar a formação de mutações (GUTTERIDGE, 1995).

O estresse oxidativo, portanto, resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano consequente (RIBEIRO et al., 2005).

2.2.2 Sistema de defesa antioxidante

O surgimento do oxigênio na atmosfera, ao longo dos períodos evolucionários, trouxe como consequência a sua toxicidade, já que seus metabólitos são muito reativos. Há afirmações que em consequência disso, alguns organismos morreram, alguns escolheram processos de obtenção de energia diferentes (anaerobiose) e outros, considerados oportunistas, utilizam o oxigênio para extrair mais energia dos nutrientes, em decorrência de seu alto potencial eletroquímico e tiveram que se adaptar para se defenderem dos efeitos deletérios do oxigênio (RIBEIRO et al., 2005)

Assim, segundo Ribeiro et al. (2005), a formação endógena de ERO é uma consequência indiscutível do metabolismo aeróbio.

Para defender-se da toxicidade das ERO, o organismo apresenta mecanismo de defesa, em dois níveis distintos (RIBEIRO et al., 2005):

1. Prevenção da formação de ERO;
2. Eliminação de ERO formadas.

2.2.3 Prevenção da formação de ERO

Segundo Sies (1993), a prevenção da formação da espécie reativa de oxigênio inclui mecanismos antioxidantes. Citam-se exemplos: restrição de spin do oxigênio, o que diminui sua reatividade com biomoléculas, o transporte de oxigênio na forma ligada e não livre, a quelação de metais durante transporte e armazenamento, evitando a ocorrência da reação de Fenton, a eficiência da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria que mantém a formação de ERO em nível controlado.

Como citado por Schneider (2004) as ERO são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo e todas as células possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressores. Cabe salientar que a composição das defesas antioxidantes difere de tecido a tecido, de tipo de célula a tipo de célula e possivelmente de célula a célula do mesmo tipo, em um dado tecido. O sistema de defesa antioxidante está dividido em enzimático e não enzimático.

O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx), de modo que o organismo mantém as concentrações de espécies reativas de oxigênio dentro dos limites fisiológicos (RIBEIRO et al., 2005).

A catalase desempenha importante papel na eliminação do H_2O_2 , promovendo a sua catálise até água.

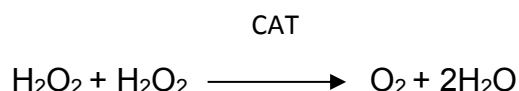


FIGURA 3- Ação da enzima catalase (RIBEIRO et al., 2005).

A glutathione redutase é uma flavoproteína dependente de NAD(P)H e da integridade da via das pentoses. É a enzima necessária para manter a glutathione em sua forma reduzida e, possivelmente, para controlar o estado redox de NADP em tecidos onde GSSG está disponível. A recuperação de GSH por GR é uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, pois, baixas concentrações de GSH estão associadas ao estresse oxidativo (VASCONCELOS, 2007).

Como citado por Ribeiro et al. (2005) a manutenção de níveis adequados de GSH é feita à custa da atividade da glutathione redutase, a qual utiliza equivalentes redutores do NADPH para manter a glutathione na forma reduzida, como substrato para glutathione peroxidase.

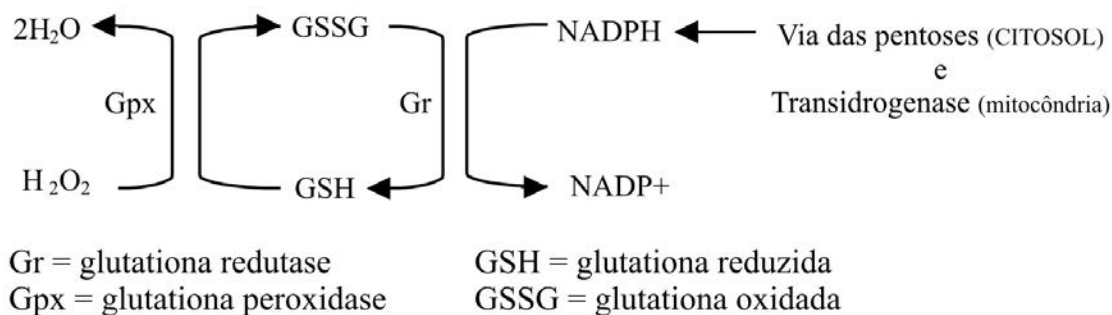


FIGURA 4- Sistema antioxidante enzimático (RIBEIRO, 2005).

Assim, Ribeiro et al. (2005) citam ainda, a atuação eficiente de GPx exige um sistema enzimático sequencial que envolve glutathione reductase e as enzimas que mantêm níveis de NAD(P)H, nos compartimentos citosólicos.

Dessa forma, tanto a CAT quanto a GPx evitam o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não haja produção de radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa (RIBEIRO et al., 2005).

O sistema não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo humano como bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q10, ácido úrico (SCHNEIDER, 2004). Além disso, diversos estudos já comprovaram que antioxidantes exógenos, obtidos dos alimentos, são essenciais para a resistência ao estresse oxidativo. Esses antioxidantes são obtidos, sobretudo de produtos de origem vegetal: compostos fenólicos, vitamina E, vitamina C e carotenoides (LAGUERRE et al., 2007).

2.2.4 Danos oxidativos causados pelas ERO e Peroxidação Lipídica

As ERO podem causar danos a todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios (peroxidação dos lipídeos). O alvo celular primário pode variar, dependendo na célula, do tipo de estresse imposto e quão severo é esse estresse (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

A peroxidação de lipídios é definida como “a deterioração oxidativa de lipídios

poli-insaturados”. Ácidos graxos poli-insaturados são aqueles que contêm duas ou mais duplas ligações carbono-carbono ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$). Os ácidos graxos poli-insaturados são, devido a suas múltiplas duplas ligações, excelentes alvos para o ataque de radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

A peroxidação de lipídeos é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes (Figura 5), onde L representa o lipídio (GARDÈS-ALBERT et al., 1991). A fase de iniciação representa o início da peroxidação, na qual o ácido graxo poliinsaturado sofre o ataque de uma espécie que é suficientemente reativa, como o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), para abstrair um átomo de hidrogênio (H) de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), formando um radical centrado em carbono ($-\text{CH}^\bullet-$). Este radical sofre um rearranjo molecular formando um produto mais estável, o dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1994). Em meio aeróbico, o radical inicialmente formado combina-se com o oxigênio formando o radical peroxila ($\text{LOO}^\bullet$), o qual pode abstrair átomos de hidrogênio de moléculas lipídicas, gerando novos radicais peroxila e lipoperóxidos promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um acúmulo de hidroperóxidos lipídicos (LOOH), que podem destruir a estrutura e função da membrana (WELCH et al., 2002). O processo de terminação consiste na aniquilação dos radicais formados originando produtos não radiculares (GARDNER, 1989; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

$\text{LH} + \text{OH}^\bullet \text{ (ou } \text{LO}^\bullet)$	$\longrightarrow$	$\text{L}^\bullet + \text{H}_2\text{O (ou } \text{LOH)}$	Iniciação
$\text{L}^\bullet + \text{O}_2$	$\longrightarrow$	$\text{LOO}^\bullet$	Propagação
$\text{LH} + \text{LOO}^\bullet$	$\longrightarrow$	$\text{L}^\bullet + \text{LOOH}$	Propagação
$\text{LOO}^\bullet + \text{L}^\bullet$	$\longrightarrow$	LOOL	Terminação

FIGURA 5- Etapas da peroxidação lipídica

A peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade de LDL contribui para a aterosclerose. As HDL(colesterol) são lipoproteínas de alta densidade, que removem o excesso de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, sendo considerado um agente que previne a aterosclerose. No entanto as HDL também podem sofrer lipoperoxidação (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

A concentração dos produtos de fluidos biológicos e tecidos têm sido estudados extensivamente como potenciais biomarcadores do estresse oxidativo in vivo (DALLE-DONNE et al., 2006; LEE et al., 2008; YOSHIDA et al., 2008). Muitos estudos mostram a associação existente entre o aumento do estresse oxidativo e a peroxidação lipídica e o surgimento de doenças crônicas (BASU, 2008; DALLE-DONNE et al., 2006; LEE et al., 2009). Portanto, a lipoperoxidação in vivo pode ser relacionada como mecanismo subjacente no processo de envelhecimento e no desenvolvimento de diversas doenças crônicas.

2.2.5 Coenzima Q10

Em 1957, Frederick Crane e sua equipe descobriram, na mitocôndria do coração de boi, a Coenzima Q10, também conhecida como ubiquinona (PRAKASH et al., 2010). Depois de descoberta foi isolada e conseguiu obter a informação completa acerca da sua estrutura química e também acerca da sua síntese. Esse composto é uma quinona, semelhante a uma vitamina, é lipossolúvel e um pó cristalino na sua forma pura.(BHAGAVAN; CHOPRA, 2007).

A CoQ10 pode ser obtida por duas vias: por via exógena, pela ingestão de alimentos ou por via endógena, pelo ciclo de mevalonato.

Os alimentos que contém CoQ10 são soja, amêndoas, nozes, vegetais verdes como espinafre (LITARRU, 1994), carnes, aves e brócolis (ELLIN et al; KUMAR et al, 2009)

O ciclo do mevalonato, tem como substrato inicial a acetil-CoA e prossegue com a produção do mevalonato e outros intermediários que, para além de ter o colesterol como produto final, tem a CoQ10 e o dolicol(GOLDSTEIN et al., 2010), sendo esse último muito importante na glicosilação proteica.(LITARRU, 1994).

2.2.6 L- Tiroxina

São hormônios hidrofóbicos que circulam ligadas a proteínas plasmáticas carreadoras, principalmente a α -globulina de ligação da tiroxina (MURATA et al., 1986). Embora haja evidências de ações extra nucleares (membrana plásmica e mitocôndrias) dos hormônios tireoidianos, o que está comprovado é a sua ação nuclear, desencadeada pela ocupação de receptores nucleares que exibem grande afinidade pelo T₃, ativando a transcrição gênica e promovendo, assim, a síntese de proteínas específicas, como fatores de crescimento, hormônios. (STERLING, 1979).

Os hormônios tireoidianos desempenham um papel central na diferenciação, desenvolvimento e metabolismo de energia. No hipertireoidismo devido ao metabolismo oxidativo acelerado nos mitocôndria, há produção de espécies reativa de oxigênio (ERO). Está bem estabelecido que a peroxidação induzida ocorre principalmente na membrana celular, eventualmente, leva a uma perda. Os hormônios da tireóide têm marcados efeitos sobre o músculo esquelético. Eles após a expressão do gene e isoforma, e este modificar as características contráteis e metabólicas do tecido.

2.2.7 Exercício Físico e Estresse Oxidativo

O exercício físico induz aumento de até 20 vezes no volume de oxigênio total consumido (ASTRAND; RODAHL, 1986). Assumindo que cerca de 2 a 5% do O₂ consumido dá origem a espécies reativas de oxigênio (ERO) esse aumento no consumo de oxigênio induzido pelo exercício físico está associado a um aumento na produção de tais espécies (JENKINS; GOLDFARB, 1993). A alta produção de ERO é responsável por várias ações deletérias, tais como aumento nos níveis de peroxidação de lipídeos de membrana (ALESSIO, 1993), aumento na carbonilação de proteínas e até danos ao DNA intracelular (RADAK, et al; 1999), o que em última instância altera e

prejudica o metabolismo intracelular, podendo inclusive ocasionar morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

O desempenho de jogadores de futebol vem sendo melhorado nas últimas décadas. A distância percorrida em média durante uma partida aumentou em mais de 50%, comparada com o que se observava na década de 70 (BANGSBO, 1994). Esta melhora se deu, provavelmente, pelo desenvolvimento e intensificação das cargas de treinamento físico aplicado aos atletas de futebol ao longo destes anos. A intensidade do treinamento físico está diretamente relacionada com os níveis de produção de EROs (ALESSIO, et al 1988) e também com a adaptação das enzimas antioxidantes (POWERS et al., 1994; SMOLKA et al; 2000). Desta forma, níveis eficientes de defesa antioxidante e consequentemente baixos níveis de estresse oxidativo são desejados como resposta adaptativa a um treinamento eficiente, o que evitaria ao máximo a instalação de processos de fadiga. Essa resposta poderia manter os níveis de desempenho pouco alterados, bem como evitar o aparecimento de lesões musculares ocasionadas por este tipo de estresse ao longo da temporada competitiva.

3 OBJETIVO

- Objetivo Geral
 - Avaliar o efeito protetor da Coenzima Q10 sobre os danos oxidativos induzidos no músculo sóleo de ratos
- Objetivos Específicos
 - Induzir danos musculares através da L-tiroxina
 - Induzir o estresse oxidativo através da L-tiroxina
 - Avaliar o efeito antioxidante da Coenzima Q10

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: atividade das enzimas Creatina Quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) no soro sanguíneo; atividade das enzimas glutathiona redutase (GR) e glutathiona peroxidase (GPx), concentração de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e lipoperoxidação no homogenato do músculo sóleo de rato.

4.1 Reagentes

A L-tiroxina e a Coenzima Q10 foram adquiridas da empresa Pharma Nostra Comercial Ltda.

4.2 Avaliação ética

A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Campus da Unesp de Dracena certificou que os procedimentos utilizando animais estão de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Protocolo nº. 35/2012).

4.3 Animais e tratamento

Ratos Wistar machos de aproximadamente 200 g, provenientes do Biotério Central da Unesp (Campus de Botucatu), ficaram alojados no Biotério do Campus de Dracena, em número de 6 animais por caixa, com cobertura metálica e serragem de madeira. As caixas plásticas, com dimensões (CxLxA) 41x34x16 cm, foram armazenadas sob temperatura controlada de aproximadamente 22°C. Os animais receberam alimento e água *ad libitum* e foram divididos em quatro grupos de seis animais de acordo com cada tratamento, por 30 dias: Grupo 1 (G1, controle), recebeu apenas o veículo da L-tiroxina e óleo de milho (via intraperitoneal); Grupo 2 (G2), recebeu o veículo da L-tiroxina e Coenzima Q10 (10 mg/kg de peso vivo, de acordo com (EL-SHEIKH et al; 2012) dissolvida em óleo de milho (via oral por gavagem); Grupo 3 (G3), recebeu a L-tiroxina (0, 3 mg/kg de peso vivo, de acordo com (AHMED et al., 2006) dissolvida em NaOH 0, 01 M, e posteriormente diluída 10 vezes em soro

fisiológico estéril; Grupo 4 (G4), recebeu a Coenzima Q10 (via oral) e L-tiroxina (via intraperitoneal).

A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Campus da Unesp de Dracena certificou que os procedimentos utilizando animais estão de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Protocolo nº. 35/2012).

4.4 Análises bioquímicas

Após os 30 dias de tratamento os animais foram eutanasiados por decapitação e foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK) no soro sanguíneo; atividade das enzimas glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx), concentração de glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG), além da peroxidação dos lipídeos de membrana no homogenato de músculo sóleo.

4.5 Análise das enzimas séricas indicadoras de lesões musculares

O sangue dos animais foi colhido individualmente em tubos tipo “Falcon” de 15 mL e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos para coagulação. O soro foi separado por centrifugação, com velocidade de 3000 rpm por 15 minutos mantidos em gelo a 4°C. A atividade sérica das enzimas indicadoras de lesões musculares (AST e CK) foi dosada por meio de kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

4.6 Preparação do homogenato de músculo sóleo

Após a eutanásia, o músculo sóleo dos animais foi retirado e colocado em um béquer com 1,0 mL de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 1 mM e HEPES 10 mM com pH 7,2 a 4°C, onde foi cortado com tesoura e transferido para um tubo de ensaio com o uso de mais 1,0 mL do meio. O músculo picotado foi levado para um homogeneizador do tipo Turrax e homogeneizado 3 vezes por 15 s com intervalos de 1 minuto.

A determinação de proteína no homogenato do meio da reação do biureto, de acordo com Cain e Skilleter (1987) usando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4.7 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi determinada de acordo com o método de Hafeman et al., 1974 com algumas modificações. Em cubeta de quartzo de volume de 4 mL foram adicionados, 1 mL de tampão fosfato de sódio 0, 1 mM, pH 7, 6, contendo EDTA 0, 5 mM, 10 µL de triton X-100 a 10%, homogenato do músculo sóleo (1 mg de proteína), 5 µL de GSH 100 mM e 20 µL de NADPH 10 mM. Após 1 minuto de incubação, foram adicionados 10 µL de H₂O₂ 25 mM e a variação da absorvância foi determinada no comprimento de onda de 340 nm em um espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800 (Fullerton, CA, USA). Os dados foram expressos em U/mg de proteína.

4.8 Atividade da enzima glutathiona redutase (GR)

A atividade da enzima GR foi determinada de acordo com o método de Carlberg; Mannervick, 1975 com algumas modificações. Em cubeta de quartzo de volume de 4 mL foram adicionados, 1 mL de tampão fosfato de sódio 0, 1 mM, pH 7, 6, contendo EDTA 0, 5 mM, 10 µL de triton X-100 a 10%, homogenato do músculo sóleo (1 mg de proteína) e 10 µL de GSSG 100 mM. Em seguida as amostras foram incubadas a 30°C por 5 minutos. Logo após foram adicionados 10 µL de NADPH 10 mM e a variação da absorvância foi determinada no comprimento de onda de 340 nm em um espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800 (Fullerton, CA, USA). Os dados foram expressos em U/mg de proteína.

4.9 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

A determinação da concentração de GSH e GSSG no homogenato de músculo sóleo dos animais foi realizada de acordo com Hissin e Hilf (1976). Em tubos do tipo “eppendorf” de 2 mL, foram adicionados o homogenato (1 mg de proteína), meio

contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7, 4 para completar 1 mL e após uma leve homogeneização foram adicionados 500 μ L de ácido tricloroacético 13%. A mistura foi agitada e centrifugada a 9000 *g* por 3 min. Para a dosagem de GSH, em tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 1800 μ L de tampão contendo NaH_2PO_4 0, 1 M, pH 8, 0, com EDTA 5 mM, 100 μ L do sobrenadante obtido da centrifugação e 100 μ L de OPT (o-ftalaldeído) 1 mg/mL. Em seguida os tubos foram agitados e mantidos por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Foi efetuada a leitura em espectrofluorímetro RFPC 5301 (Shimadzu, Japão) com comprimento de onda de 350 e 420 nm para emissão e excitação, respectivamente, com abertura de fenda 3 em ambos os casos.

Para a dosagem de GSSG, 250 μ L do sobrenadante inicial foram tratados com 250 μ L de N-etilmaleimida (NEM) 0, 04 M e submetidos ao mesmo procedimento de mistura com o OPT descrito anteriormente. As concentrações de GSH e GSSG foram estimadas por meio de uma curva padrão.

4.10 Avaliação da peroxidação de lipídeos de membrana

A peroxidação de lipídeos de membrana foi determinada utilizando o método do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) de acordo com Ohkawa et al., 1979. Para tanto, o homogenato do músculo sóleo (5 mg de proteína) foi colocado em tubo de ensaio e foram adicionados 0,2 mL de SDS (8,1%), 1,5 mL de ácido acético (20%), 1,5 mL de TBA (solução aquosa a 0,67%), o volume foi completado até 4 mL com água deionizada (milli-Q) e a mistura colocada em banho-maria a 95°C por 60 min. Após o período de incubação os tubos foram retirados e resfriados em banho de gelo e adicionado 1 mL de água milli-Q e o complexo MDA-TBA extraído com 5 mL de n-butanol. Em seguida os tubos foram centrifugados a 2000 g por 10 minutos, a parte orgânica foi coletada e a absorvância medida a 535 nm. A concentração de malondialdeído (MDA) foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os dados foram expressos em nmol/mg de proteína.

4.11 Análise estatística

A significância estatística dos dados experimentais foi determinada pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo considerados estatisticamente significantes resultados com valores de $P < 0,05$. As análises foram realizadas aplicando o programa GraphPad Prism, versão 4.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA 03/04/2003).

5 RESULTADOS

5.1 Análise da atividade sérica das enzimas creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST)

O tratamento com L-tiroxina (G3) promoveu um aumento significativo na atividade sérica das enzimas CK e AST (Figuras 1A e 1B, respectivamente) em relação ao controle (G1), as quais foram utilizadas como parâmetro de lesão muscular. A comparação entre os Grupos 3 e 4 mostra que o tratamento com a Coenzima Q10 protegeu o músculo sóleo dos danos provocados pela L-tiroxina conforme observado pela diminuição significativa da liberação das enzimas (G4).

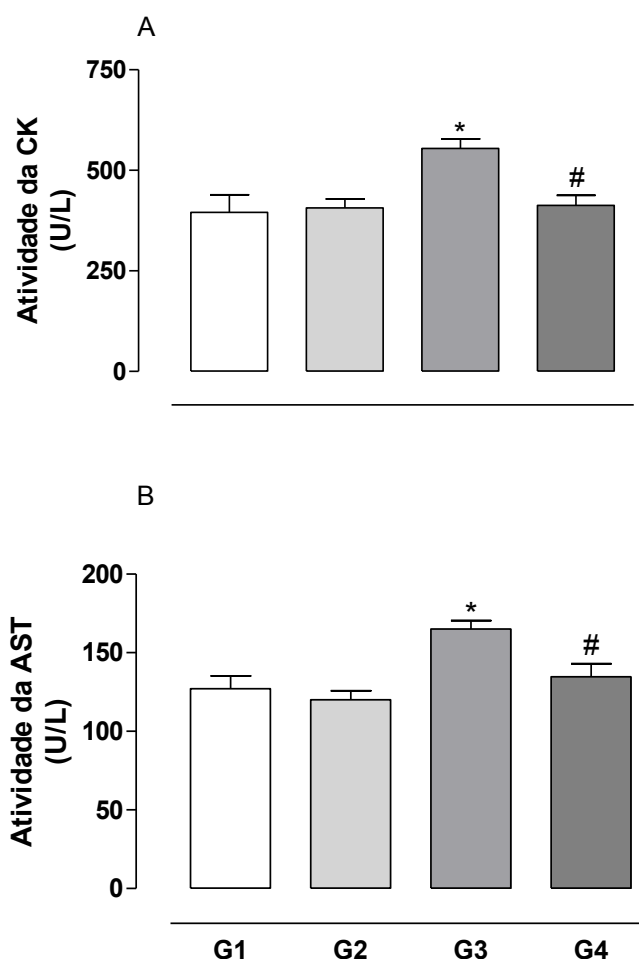


FIGURA 6. Atividade das enzimas CK e AST sobre o dano muscular induzido pela L-tiroxina avaliado pela liberação das enzimas creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) no soro de ratos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = controle CoQ10; G3 = L-tiroxina; G4 = L-tiroxina + CoQ10. *Significativamente diferente do controle (G1) e (G2) ($P < 0,05$). #Significativamente diferente do tratado com L-tiroxina (G3) ($P < 0,05$).

5.2 Análise da atividade das enzimas Glutathiona Peroxidase (GPx) e Glutathiona Redutase (GR) no homogenato de músculo sóleo

A análise da atividade das enzimas GPx e GR no homogenato de músculo sóleo (Figuras 2A e 2B, respectivamente) demonstrou que houve uma redução significativa no Grupo tratado com a L-tiroxina (G3) em relação ao controle (G1). O tratamento dos animais com a Coenzima Q10 protegeu contra o efeito provocado pela L-tiroxina sobre as enzimas (G4).

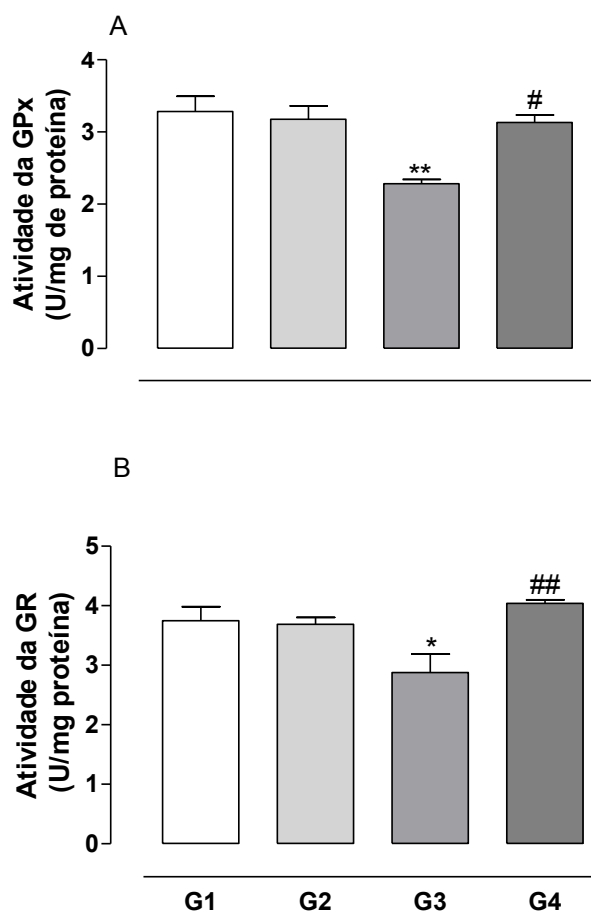


FIGURA 7- Efeito protetor da Coenzima Q10 (CoQ10) sobre a diminuição da atividade das enzimas Glutathiona Peroxidase (GPx) e Glutathiona Redutase (GR) induzida pela L-tiroxina no homogenato de músculo sóleo de ratos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = controle CoQ10; G3 = L-tiroxina; G4 = L-tiroxina + CoQ10. *, **Significativamente diferente do controle (G1) e (G2) (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$). #, ##Significativamente diferente do tratado com L-tiroxina (G3) (# $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$).

5.3 Concentração de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) no homogenato de músculo sóleo

O tratamento dos animais com a L-tiroxina (G3) promoveu uma redução significativa na concentração de GSH no homogenato de músculo sóleo em relação ao Grupo controle (Figura 3A). O tratamento dos animais com a Coenzima Q10 protegeu o músculo contra o efeito da L-tiroxina (G4). Ao mesmo tempo, observou-se um aumento na concentração de GSSG no homogenato de músculo sóleo dos animais tratados com L-tiroxina (G3) indicando que essa substância induziu a oxidação da glutathiona presente no músculo (Figura 3B). O tratamento dos animais com a Coenzima Q10 também protegeu o músculo contra o efeito da L-tiroxina (G4).

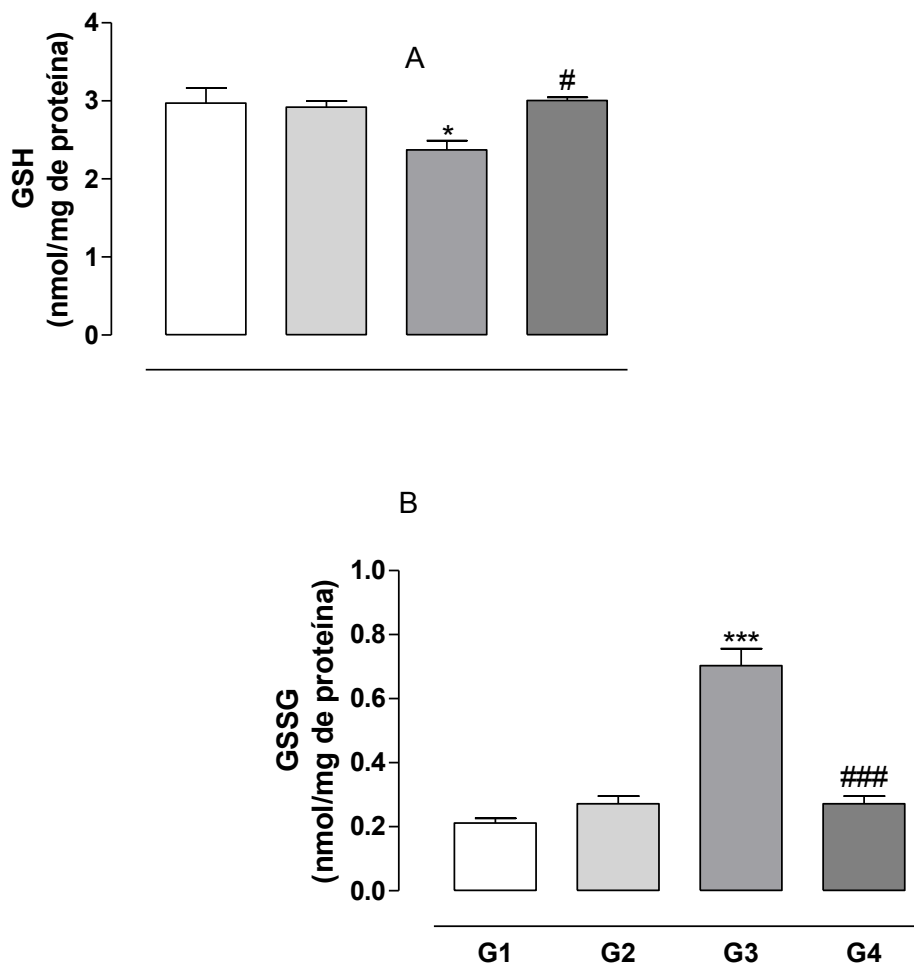


FIGURA 8- Efeito da Coenzima Q10 sobre a variação na concentração de GSH e GSSG induzida pela L-tiroxina no homogenato de músculo sóleo de ratos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = controle CoQ10; G3 = L-tiroxina; G4 = L-tiroxina + CoQ10. *, ***Significativamente diferente do controle (G1) (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$). #, ###Significativamente diferente do tratado com L-tiroxina (G3) (# $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$).

5.4 Oxidação dos lipídeos de membrana no homogenato de músculo sóleo

A oxidação dos lipídeos de membrana do homogenato de músculo sóleo foi avaliada por meio da produção do malondialdeído (MDA). Em relação à concentração de MDA, os resultados demonstram que o tratamento com L-tiroxina (G3) estimulou significativamente o aumento na produção desse composto em relação ao Grupo controle (G1), indicando que houve peroxidação dos lipídeos de membrana (Figura 4). O tratamento com a Coenzima Q10 protegeu o músculo contra os danos oxidativos provocados pela L-tiroxina (G4).

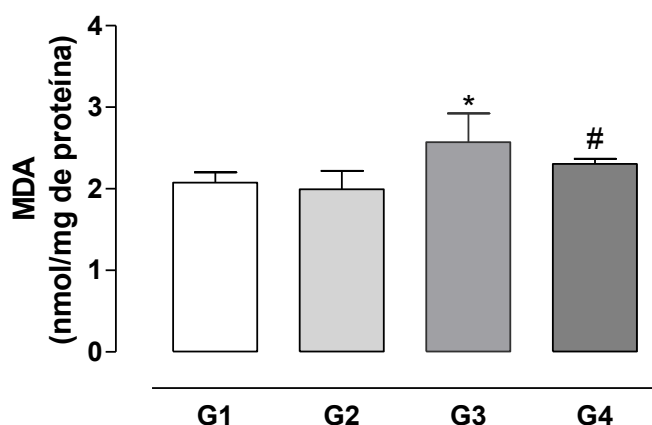


FIGURA 9- Efeito protetor da Coenzima Q10 (CoQ10) sobre o aumento na concentração de MDA induzido pela L-tiroxina no homogenato de músculo sóleo de ratos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = controle CoQ10; G3 = L-tiroxina; G4 = L-tiroxina + CoQ10. *Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$). #Significativamente diferente do tratado com L-tiroxina (G3) ($P < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Estudos recentes demonstraram a importância da CoQ10 na resistência do DNA aos danos oxidativos. O interesse pela CoQ10 tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido a capacidade de transferir elétrons e atuar como antioxidante (GRONEMBERG et al., 2005; KUMAR et al., 2009). Na sua forma reduzida, a CoQ10 é um poderoso antioxidante que previne os danos oxidativos causados pelos radicais livres, incluindo a oxidação de lipídios na membrana mitocondrial. Sua atuação como antioxidante também ocorre por meio da ativação e aumento da expressão de proteínas mitocondriais desacopladoras, um efeito antiapoptótico que resulta na redução de geração de radicais livres (CHATURVEDI; BEAL, 2008; MARCOFF; THOMPSON, 2007).

O exercício induz mudanças reversíveis na ultraestrutura do músculo esquelético, com elevação da permeabilidade do sarcolema e das proteínas musculares, tais como a mioglobina, creatina quinase (CK) e a aspartato aminotransferase (AST) que são liberadas na circulação (MCCURTCHEN et al., 1992). Sendo assim, a determinação da atividade sérica das duas enzimas, CK e AST, fornece uma clara indicação de uma provável lesão tecidual (MOTTA, 2003).

Neste estudo, no Grupo tratado com a L-tiroxina os valores de AST e CK estão significativamente aumentados, comprovando que a substância pode ser usada para simular os danos musculares resultantes do exercício, e fazendo uma comparação com os Grupos tratados com e sem a CoQ10, foi possível observar o efeito protetor da mesma contra os danos musculares provocados pela L-tiroxina. (SAHOO et al., 2007)

Segundo Bentinger et al., 2007 a Coenzima Q10 tem como função primária prevenir a produção de radicais livres e a iniciação do processo de peroxidação lipídica.

Fisiologicamente, o organismo pode se defender da agressão mediada pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) utilizando-se das reservas de enzimas antioxidantes, entre elas a Glutathione Peroxidase (GPx) e a Glutathione Redutase (GR), segundo Halliwell; Gutteridge, 2007. Os resultados deste estudo mostraram uma diminuição nas atividades das enzimas GPx e GR conforme observado no homogenato de músculo sóleo dos animais tratados com L-tiroxina em comparação com o Grupo

controle. Esses dados estão de acordo com Seymen et al., 2004 que relataram que o tratamento com a L-tiroxina induz a formação de ERO e provoca consequentemente uma inibição da atividade específica da GPx, enzima responsável pela conversão de H_2O_2 em H_2O . O tratamento dos animais com a CoQ10, demonstrou um efeito protetor da substância, uma vez que a atividade das enzimas GPx e GR foram reestabelecidas para valores próximos ao Grupo controle.

A glutathiona reduzida (GSH) pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes oxidantes (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998). O estresse oxidativo é caracterizado por diminuição nos níveis de GSH, aumentos na glutathiona oxidada (GSSG) e lipoperoxidação, bem como redução da atividade de enzimas antioxidantes (SIES, 1986). O tratamento com a L- tiroxina induziu o estresse oxidativo no homogenato do músculo sóleo de ratos como indicado pela diminuição nas concentrações de GSH e um aumento nas concentrações de GSSG no homogenato analisado. Essas alterações encontradas no ciclo redox da glutathiona no presente estudo condizem com os encontrados por Syemen et al., 2004 no músculo esquelético e Ahmed et al., 2006 no músculo cardíaco de ratos, os quais demonstraram uma diminuição significativa da GSH e aumento da GSSG em animais tratados com L-tiroxina. Em nosso estudo, o tratamento dos animais com a CoQ10, reestabeleceu as concentrações de GSH e GSSG, indicando um efeito antioxidante da substância.

De acordo com Syemen et al. (2004) a L-tiroxina estimula a geração de peróxidos lipídicos, e estes por sua vez promovem danos à membrana plasmática. Estes efeitos são condizentes aos apresentados neste estudo, visto que pela análise do homogenato constatou-se que ocorreu uma elevação na formação do MDA no homogenato de músculo sóleo dos animais tratados com a L-tiroxina, indicando a ocorrência da peroxidação lipídica. Resultado semelhante foi relatado por Sahoo et al., 2007, quando avaliaram os efeitos da L-tiroxina sobre o testículo de ratos. No presente estudo, o tratamento com a CoQ10 protegeu o músculo sóleo contra este efeito oxidante, o que pode estar associado ao fato da CoQ10 atuar como antioxidante protegendo os lipídios de membrana contra o efeito oxidativo provocado pelos radicais livres (ALLEVA, 1995; EL-SHEIKH et al., 2012; SINGH et al., 2007).

Nossos resultados indicam que a CoQ10 protege o músculo de ratos de danos oxidativos provocados pela L- tiroxina uma vez que ela manteve a atividade das enzimas Glutathione Redutase e Glutathione Peroxidase e diminuiu a lipoperoxidação. Essa proteção pode estar principalmente relacionada com a atividade antioxidante da CoQ10 e seu uso terapêutico pode ser considerado em situações clínicas.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos neste estudo pode se concluir que a CoQ10 é capaz de impedir os danos oxidativos provocados pela L-tiroxina no músculo sóleo. Dessa forma, pode-se sugerir o uso da CoQ10 para a suplementação de atletas sujeitos a danos oxidativos provocados pelo exercício.

8 REFERÊNCIAS

- AHMED, M. M.; LAMIAA, N. A. H.; MOHAMED FATH EL-BAB.; HALA S. A. G. Attenuation of oxidative stress in plasma and tissues of rats with experimentally induced hyperthyroidism by caffeic acid phenylethyl ester. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 100, p. 84-90, 2007
- AIRES, M.M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1252p
- ALESSIO, H.M. Exercise-induce oxidative stress. **Med. Sc Sports Exerc.**, v.25, p.218-24, 1993
- ALESSIO, H.M.; GOLDFARB, A.H.; CUTLER, R.G. MDA content increases in fast and slow twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. **Am. J. Physiol.**, v.255, p.C874-77, 1988.
- ANTUNES NETO, J.M.F.; PAULA, L.B. Índices de estresse oxidativo em sujeitos com diferentes níveis de composição corporal e aderência a prática de atividade física. **Braz. Biometric.**, v. 5, n. 2, p. 117-131, 2011
- ASAYAMA, K.; DOBASHI, K.; HAYASHIBE, H.; MEGATA, Y.; KATO, K. Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat possible mechanism on injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism. **Endocrinology**, v. 121, p. 2112-2118, 1987
- ASCENSÃO, A.; MAGALHÃES, J.; SOARES, J.M.; FERREIRA, R.M.; NEUPARTH, M.J.; APPELL, H.J.; DUARTE, J.A; Cardiac mitochondrial respiratory function and oxidative stress: the role of exercise. **Int. J. Sports Med.**, v.26, p.258-67, 2005.
- ASTRAND, P.O.; RODAHL, K. **Textbook of work physiology**. New York: McGraw Hill, 1986
- BADHWAR, A.; DUNGEY, A. A.; HARRIS, K. A.; SCOTT, J. A.; MCCARTER, S. D.; SCOTT, J. R.; FORBES, T. L.; POTTER, R. F. Limitations of ischemic tolerance in oxidative skeletal muscle: perfusion vs tissue protection. **J. Surg. Res.**, v. 109, p. 62-67, 2003.
- BANGSBO, J. The physiology of soccer. **Acta Physiol. Scand.**, v.619, p.1-155, 1994.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006
- BHAGAVAN, H.; CHOPRA, R. Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulation. **Mithochondrion**, v.7, p.s72-s88, 2007.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.**, v.134, p.707-716, 1973.
- CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (Eds.), **Biochemical toxicology**. Oxford; IRL Press, 1987. p.217-254, 1987.

CAMMARATO, A.; DAMBACHER, C. M.; KNOWLES, A. F.; KRONERT, W. A.; BODMER, R.; OCORR, K.; BERNSTEIN, S. I. Myosin transducer mutations differentially affect motor function, myofibril structure, and the performance of skeletal and cardiac muscles. **Mol. Biol. Cell.**, v. 19, p. 553-562, 2008

CAPITANIO, M.; CANEPARI, M.; CACCIAFESTA, P.; LOMBARDI, V.; CICCHI, R.; MAFEI, M. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.103, p.87-92, 2006

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **J. Biol. Chem.**, v.250, p.5475-5480, 1975.

CLARKSON, P. M.; SKILLETER, D.N. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.72, p. 637-647, 2000

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin. Chem.**, v. 52, p. 601-623, 2006.

DI MEO, S.; VENDITTI, P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. **Biol. Signals Recept.**, v.10, p.125-40, 2001.

DUARTE, J.A.; NEUPARTH, M.J.; FERREIRA, R.; ASCENSÃO, A.; MAGALHÃES, J.; FERNANDES, E.; AMADO, F.; CARVALHO, F. In vivo hydrogen peroxide production in soleus muscle is enhanced in aged mice both at rest and during exercise. **Free Rad. Biol. Med.**, v36, p 563-564, 2004

EISEMBERG, B. R.; SALMONS S. The reorganization of subcellular structure in muscle undergoing fast-to-slow type transformation. A stereological study. **Cell Tissue Res.**, v. 220, n. 3, p. 449-471, 1981.

ERNSTER, L.; DALLNER, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1271, p.195-204, 1995.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Curr. Opin. Cell Biol**, v. 15, p. 247-254, 2003.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

GARDÈS-ALBERT, M.; JORE, D.; FERRADINI, C. Membrane lipid peroxidation: pulse and g-radiolysis in oxyradical research. In: VIGO-PELFREY, C. (Ed). **Membrane lipid oxidation**. Santa Clara: CRC Press, 1991. p.2-30.

GOLDSPINK G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. **Physiology** v.20, p.232-238, 2005

GOLDSPINK G. Molecular mechanisms involved in the determination of muscle fiber mass and phenotype. **Adv Exerc Sports Physiol**. 1999; 5(2):27-39.

GUNNING, P.; HARDEMAN, E. Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. **FASEB J.** v.5, n. 15, p. 306-370, 1991

GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinic. Chemist.**, v. 41, n. 12, p.1819-1828, 1995.

HAFEMAN, D.G.; SUNDE, R.A.; HOEKSTRA, W.G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **J. Nutr.**, v.104, p.580-587, 1974.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** 2nd. ed. Oxford: Clarendon, 1989.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Braz. J. Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HOOPER, S. L.; THUMA, J. B. Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins. **Physiol. Rev.**, v. 85, p. 1001-1060, 2005.

JENKINS, R.R.; GOLDFARB, A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. **Med. Sci Sports Exerc.**, v.25, p.210-212, 1993.

KAGAN, V.; SERBINOVA, E.; PACKER, L. Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.169, p. 851-857, 1990

Kumar A, Kaur H, Devi P, Mohan V. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. **Pharmacol Ther.** 2009;124(3):259-68.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Prog Lipid Res.**, v. 46, p. 244-282, 2007.

LASS, A.; SOHAL, R.S. Electron transport-linked ubiquinone dependent recycling of α -tocopherol inhibits autoxidation of mitochondrial membranes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.352, p.229-236, 1998.

LEFREUVE, B.; CROSSIM, F.; FONTAINE-PERUS, J; BANDMAM, E.; GARDAHUAT, M F. Innervation regulates myosin heavy chain isoform expression in developing skeletal muscle fibers. **Mech Dev.**, v.58, n.12.p.115-127, 1996

LITARRU, G. **Energy and defense- facts and perspectives on coenzyme Q10 in biology and medicine.** Roma: Casa Editrice Scientifica Internazionale, 1994.

MURATA, Y.; TAKAMATSU, J.; REFETOFF, S. Inherited abnormality of thyroxine-binding globulin with no demonstrable thyroxine-binding activity and high serum levels of denatured thyroxine-binding globulin. **N. Engl. J. Med.**, v. 314, p. 694-699, 1986.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 31, 1287- 1312, 2001.

NYAKAS, C.; GOTO, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Rad. Biol. Med.**, v.27, p.69-74, 1999.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, v.95, p.351-358, 1979

PEDROSA, J. P.; CIRNE, L. E. M. R.; NETO, J. M. M. Teores de bixina e proteína em sementes de urucum em função do tipo e do período de armazenagem. **Rev. Bras. Eng. Agríc. Amb.**, v. 3, p. 121-123, 1999.

POLI FIGUEIREDO, L. F.; CRUZ JUNIOR, R. J.; MORSCH, R. D. Desvascularização e reperfusão no trauma vascular. In: MURILO, R. **Trauma vascular**. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. p. 628-633

POWERS, S.K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; JI, L.L.; MARTIN, D.; HERB, R.A.; DUDLEY, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v.266, p.R375-380, 1994.

PRAKASH, S.; SUNITHA, J. Role of CoenzymeQ10 as an antioxidant and bioenergizer in periodontal diseases. **Indian J. Pharmacol.**, v.42, p.334-337, 2010

RADAK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; PUCSOK, J.; SASVARI, M.; JANSEN, K. M.; PAVLATH, G. K. Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth. **J Cell Biol.** v. 174, p. 403-413, 2006.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

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

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA, V.R.G. **Marcadores Pró-inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes submetidos à gastroplastia com by-pass em Y de Roux**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Programa de Pós Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Flo, disponível em:<<http://ppgn.ufsc.br/files/2009/09/Disserta%C3%A7%C3%A3o-Vivian%20Rodrigues-Gon%C3%A7alves-da-SILVA.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2013

SMOLKA, M.B.; ZOPPI, C.C.; ALVES, A.A.; SILVEIRA, L.R.; MARANGONI, S.; PEREIRA-DASILVA, L.; NOVELLO, J.C.; MACEDO, D.V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **Am. J. Physiol.**, v.279, p.R1539-45, 2000

TONKONOGLI, M.; SAHLIN, K. Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. **Exerc. Sport. Sci. Rev.**, v.30, p.129-37, 2002

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova.**, v.30, p. 1323-1338, 2007.

WELCH, K.D.; DAVIS, T.Z.; VAN EDEN, M.E. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 32, p. 577-583, 2002

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, v.74, p.139-62, 1994.