

SHARON MARTINS FREITAS

**EFEITOS REGULATÓRIOS DA TAURINA SOBRE A
MODULAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR UM MODELO
EXPERIMENTAL DE OVERUSE MUSCULAR**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade do Extremo Sul
Catarinense para obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde.
Orientador: Prof. Dr. Ricardo
Aurino de Pinho

**CRICIÚMA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F866e Freitas, Sharon Martins.

Efeitos regulatórios da taurina sobre a modulação de parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo induzido por um modelo experimental de *overuse* muscular / Sharon Martins Freitas ; orientador : Ricardo Aurino de Pinho. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

69 p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Taurina – Efeitos fisiológicos. 2. Lesões musculares - Tratamento. 3. Exercícios de alta intensidade. 4. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE Mestrado em Ciências da Saúde – Nº 255

Com início às 14h00 (quatorze horas) do dia vinte do mês de julho de 2016 (dois mil e dezesseis), realizou-se, no bloco S, sala 24 na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Sharon Martins Freitas**, sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho, intitulada “**Possíveis efeitos regulatórios da taurina na modulação de parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo induzido por um modelo experimental de overuse muscular**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Alexandre Pastoris Müller (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof. Dr. Michael Everton Andrades (Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 15h00 (quinze horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza Coordenador do Programa. Criciúma, 20 (vinte) de julho de 2016 (dois mil e dezesseis).



Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

Diana Ghisi Daniel
Auxiliar Administrativo PPGCS



Diana Ghisi Daniel
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo exemplo de coragem e persistência em suas metas. A minha filha que tantas vezes usurpada da minha presença, mas não do meu amor, torceu por mim para a concretização deste meu sonho.

AGRADECIMENTOS

É chegado o momento de reflexão e agradecimento à quem fez parte de cada linha e pensamento expressado neste trabalho.

Nenhuma batalha é vencida sozinha, e no decorrer desta luta algumas pessoas estiveram ao meu lado e percorreram este caminho como verdadeiros soldados, estimulando que eu alcançasse a minha vitória e conquistasse o sonho de ser mestre.

Em primeiro lugar agradeço a Deus que me deu o presente da vida e me entrega a cada amanhecer a chance de eu poder lutar e possa avançar no interminável caminho da evolução como ser humano.

Agradeço aos meus pais, que não só neste momento, mas em toda minha vida estiveram comigo, incansáveis ao meu lado, dando apoio, compreensão e estímulo em todos os momentos, mesmo sabendo que as escolhas são minhas, porém sempre indicando o caminho certo.

Mãe e pai, se eu pudesse voltar à vida em outro momento, e tivesse a oportunidade de escolher meus pais, seriam vocês os escolhidos, mas tenho certeza que a escolha foi de vocês de me darem a oportunidade gratificante de crescer e viver amparada por muito amor.

Agradeço a uma pessoa muito especial na minha vida, Israel Riella, meu porto seguro, amor e amigo por muitos anos. Você foi único em todos os sentidos e te digo com o coração repleto de carinho: “Há laços na vida que jamais se romperão...Os laços são eternos pelo carinho compartilhado, pela sabedoria e pelos belos instantes vividos... As palavras são indispensáveis quando quem fala é o coração.”

Agradeço a minha filha amada Victória, minha inspiração para ser uma pessoa melhor cada dia, pela compreensão e paciência nos dias que não pude dar atenção ou estar ao seu lado. Sei que me perdi algumas vezes neste caminho, mas ao lembrar do seu rosto eu percebia o motivo real de eu querer ser uma pessoa melhor por te amar incondicionalmente. Quero ser um exemplo para você!

Agradeço com inestimável carinho e imensa admiração ao meu orientador, Ricardo Aurino Pinho por todo empenho, sendo incansável na dedicação e paciência em me ensinar para que este sonho fosse alcançado. Obrigado por aceitar-me como orientanda, por me estimular quando precisei, por ler muitas vezes o meu trabalho, sendo duro quando necessário, mas também amigo. Te agradeço de coração por seres meu orientador e amigo, e por teres distinguido os momentos em que precisei de um e de outro. Você é parte fundamental desta trajetória!

Agradeço muito a Renata Nesi pelo apoio, suporte e as palavras de motivação quando me senti insegura. Te admiro muito!

Agradeço a Anandi pelo projeto brilhante!

Agradeço a todas as Ics (Stella, Fernanda, Marcela) que me auxiliaram dia-a-dia na execução desta pesquisa com todo apoio prático, e as conversas e as risadas nos trabalhos de fins de semanas, onde não perdemos o bom humor.

Agradeço a uma pessoa muito especial, Sabrina Silva, uma irmã de coração, uma irmã de outras vidas, acredito que não cruzamos nossos caminhos por acaso, até porque não acredito em acasos, e que este foi mais um “reencontro”. Tenho uma profunda admiração e amor por você, que foi meu alicerce todos os dias desde que era uma aluna voluntária de mestrado e que me apoia todas as vezes onde achei que o fardo estava pesado demais e que me apoia até hoje dizendo: “amiga vai dar tudo certo! Eu te amo!” Sabrina sua felicidade e tristeza é extensiva à mim. Também te amo, amiga!

Obrigado a todos meus familiares e amigos que me apoiaram quando decidi seguir adiante estudando, almejando o título de mestre.

Obrigada à todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado.

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos os corações das pessoas. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar.”

RESUMO

Exercícios de elevada intensidade ou uso excessivo da musculatura sem tempo suficiente para uma recuperação que permita a adaptação estrutural ao estímulo favorecem lesões musculares que envolvem eventos celulares complexos. A suplementação de antioxidantes tem demonstrado efeito protetor sobre essas lesões por reduzir a produção de oxidantes em excesso. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos regulatórios da taurina sobre a lesão muscular e na modulação de mediadores bioquímicos envolvidos no remodelamento celular após lesão muscular por *overuse*. Vinte e seis camundongos machos Swiss, foram divididos em quatro grupos: controle (CTR), *overuse*, taurina (Tau) e *overuse* + taurina (*overuse* +Tau). Exercícios em esteira de alta intensidade foram conduzidos por 21 dias concomitantemente à suplementação de taurina (150 mg/Kg), seguido pela eutanásia. O quadríceps foi removido cirurgicamente para posteriores análises histológicas, função mitocondrial, parâmetros de estresse oxidativo e marcadores de reparo tecidual e danos em DNA. Os resultados mostram que o grupo *overuse* demonstrou uma redução na área de fibras musculares e um aumento significativo no número de núcleos centrais, no potencial de membrana e complexo I, na produção de peróxido de hidrogênio, na lipoperoxidação e nos danos no DNA quando comparados ao controle. Por sua vez, em presença de taurina os mesmos indicadores foram revertidos, exceto no conteúdo de miogenina, onde a taurina promoveu uma redução do seu conteúdo, inclusive abaixo do controle. A partir dos dados obtidos, sugere-se que a suplementação de taurina pode modular diversos parâmetros celulares envolvidos no remodelamento após a lesão muscular por *overuse*, e essa reposta positiva da taurina possivelmente está diretamente associada à sua capacidade antioxidante.

Palavras chave: lesões musculares; treinamento físico; *overuse*; taurina; função mitocondrial; dano muscular.

ABSTRACT

Strenuous exercise or overuse of muscles promotes injuries and involves complex cellular events. The antioxidant supplementation has shown the protective effect on the lesions by reducing the production of excess oxidants. The aim of this study was to evaluate the regulatory effects of taurine on muscle injury and modulation of biochemical parameters involved in cellular remodeling after muscle injury by overuse. Twenty-four female Swiss mice were divided into four groups (n = 6). Control (CTR), overuse, taurine (Tau) and overuse + taurine (overuse + Tau). Exercises in high intensity were carried out for 21 days with concomitant supplementation of taurine (150 mg / kg), followed by euthanasia. The quadriceps muscle was surgically removed for subsequent histological analysis, mitochondrial function, oxidative stress parameters, tissue repair and DNA damage markers. The results shown that overuse group reduced the fiber area in the muscle fiber and increased the central nuclei in the numbers significantly, increased the membrane potential and complex I, increased the hydrogen peroxide production, increased the lipid peroxidation and DNA damage in relation to control. However, these indicators were significantly changed in the presence of taurine, except myogenin content. The myogenin content was reduced in taurine groups compared with overuse and control groups. Taken together, the data obtained from this study suggest that taurine supplementation might modulate various cellular parameters involved in the cellular remodeling after muscle damage by overuse, and this positive response of taurine is directly related to its antioxidant capacity.

Key Words: muscle damage; strenuous exercise; overuse; taurine; mitochondrial function.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Via de biossíntese da taurina.	33
Figura 2 - Esquema ilustrativo da estrutura molecular (à esquerda) e estrutura atômica (à direita) da taurina.	33
Figura 3. Desenho Experimental.	37
Fig. 4 (A-D).	43
Figura 4. Histologia Muscular.	43
Figura 5. Análise da função mitocondrial do quadríceps de camundongos expostos ou não a um modelo experimental de <i>overuse</i> e suplementados ou não com taurina.	45
Figura 6 - Produção mitocondrial de H ₂ O ₂ (Fig. 6A) e danos oxidativos em lipídeos (Fig. 6B) e proteínas (Fig. 6C) de quadríceps de camundongos expostos ou não a um modelo experimental de <i>overuse</i> e suplementados ou não com taurina.	47
Figura 7. Proteínas envolvidas no reparo tecidual, MyoD (Fig. 7A) e MyoG (Fig. 7B), no quadríceps de camundongos expostos ou não a um modelo experimental de <i>overuse</i> e suplementados ou não com taurina.	48
Figura 8 - Dano em DNA (Frequência de dano, Fig. 8A; Índice de dano, Fig. 8B) no quadríceps de camundongos expostos ou não a um modelo experimental de <i>overuse</i> e suplementados ou não com taurina.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4E-BP1 - Fator de Iniciação Eucariótico de Ligação 4E1
ADP – Adenosina Difosfato
AMP – Adenosina Monofosfato
ANOVA – Análise de variância simples (do inglês *analysis of variance*)
ATP – Adenosina Trifosfato
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DCIP – 2,6-Diclorofenol indofenol
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DTT – Ditioneitol
eIF4G – Fator de Iniciação Eucariótica 4G
EPM – Erro Padrão Médio
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
FD – Frequência de Dano
GPx – Glutathione Peroxidase
GSH – Glutathione
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HOCl – Ácido Hipocloroso
ID – Índice de Dano
iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível
MEF2 – Fator Potencial específico de miócito 2A
MnSOD – Superóxido Dismutase Manganês
MPO – Mieloperoxidase
MRFs – Fatores Miogênicos Reguladores
mTOR - *do inglês* mechanistic Target of Rapamycin
MyoD – Fator Regulatório na Determinação e Diferenciação do Músculo
MyoG – Miogenina
NADPH – Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
NFKβ – Fator de Necrose Tumoral β
Nrf2 – Fator Nuclear Eritróide
O₂⁻ – Ânion Superóxido
p70S6K - Proteína Quinase Ribossomal
PBS – Tampão Fosfato
PFA – Paraformaldeído
SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida para eletroforese
SOD – Superóxido Dismutase
SPSS – Statistical Package for the Social Sciences
Tau – Taurina
TauCL – Taurina – Cloramina

TauT – Transportador de Taurina

TRx – Tiorredoxina Redutase

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

XO – Xantina Oxidase

ΔpH_m – Gradiente de pH Mitocondrial

$\Delta\Psi_m$ – Potencial de Membrana Mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 LESÕES MUSCULARES	28
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E EXERCÍCIO FÍSICO	30
1.3 TAURINA	32
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	36
3.2 QUESTÕES ÉTICAS	36
3.3 AMOSTRA	36
3.4 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO E SUPLEMENTAÇÃO	36
3.5 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	37
3.6 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIA	38
3.7 HISTOLOGIA	38
3.8 CONTEÚDO DE PROTEÍNAS	38
3.9 ENSAIOS	38
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4 RESULTADOS	42
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO	68
ANEXO A. PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.	69

1 INTRODUÇÃO

Exercícios de alta intensidade são amplamente utilizados no treinamento de atletas com objetivo de ganho de massa muscular e condicionamento muscular e cardiovascular (de Paula Simola RÁ, 2016), porém, promovem frequentes lesões musculares devido a movimentos de contração forçada ou até mesmo por traumas. Essas lesões, por vezes, decorrem de fatalidades, mas em muito dos casos a origem delas decorrem do uso excessivo da musculatura sem tempo suficiente para uma recuperação que permita a adaptação estrutural ao estímulo (Difiori et al., 2014). Nessas condições, essas lesões são conhecidas como lesões por *overuse*, também chamadas de lesões crônicas, e se caracterizam por uma categoria de lesões relacionadas com um trauma cumulativo devido ao volume e intensidade da sobrecarga ou uso repetitivo e estresse muscular (Fuller et al., 2006). De acordo com Jarvienen et al. (2005) essas lesões promovem alterações locais e sistêmicas em diversos parâmetros bioquímicos e moleculares.

Em recentes trabalhos Silva et al. (2010 e 2011), demonstraram que as lesões musculares pelo exercício ocorrem frequentemente durante ou até mesmo após o exercício intenso ou exaustivo, em sessões agudas ou repetitivas, principalmente se o exercício envolve contrações musculares excêntricas o que resulta na produção e liberação sistêmica de vários mediadores inflamatórios e bioquímicos.

Além de exames de imagem, a lesão muscular é clinicamente diagnosticada por um conjunto de marcadores indiretos como dor muscular, diminuição das contrações musculares voluntárias máximas e aumento da rigidez muscular com redução da amplitude de movimento (Torres et al., 2007; Janecki et al., 2011). Entretanto, Paterno et al. (2013) salientam que lesões de menor grau, em especial aquelas que apresentam dores leves causadas por microtraumas repetitivos muitas vezes não são notificados ou são ignorados pelo atleta e isso tem dificultado o diagnóstico precoce.

Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que espécies reativas de oxigênio (ERO) e consequente estresse oxidativo estão diretamente envolvidos na lesão muscular induzida por trauma (Silveira et al., 2013) ou por exercício físico intenso (Silva et al., 2010, 2011, 2013) ou por *overuse* (Zótea et al., 2015), devido ao tecido muscular lesionado estimular a geração de ERO dependente de vários mecanismos celulares, como a inflamação, isquemia e reperfusão e metabolismo oxidativo (Jackson et al., 2005). Portanto, o grau de alteração ou regulação desses

sistemas pode determinar a eficácia da reparação muscular, bem como o nível de equilíbrio entre os sistemas anti e pró-oxidantes. Assim, é possível que as intervenções preventivas ou terapêuticas possam atenuar os efeitos deletérios induzidos pela lesão muscular.

Os efeitos da produção de ERO de forma sistêmica ou locais decorrentes do dano muscular dependem da capacidade antioxidante celular. O sistema antioxidante se constitui de enzimas, tais como a catalase, glutathione peroxidase (GPx), tioredoxina redutases (TRx), superóxido dismutase (SOD), e antioxidantes solúveis, tais como a glutathione (GSH) e vitamina E. Adicionalmente, inúmeras outras substâncias têm sido apontadas como antioxidantes por desempenharem direta ou indiretamente um papel fundamental na manutenção de baixos níveis de ERO. Neste sentido, a taurina é uma molécula que vem chamando a atenção na literatura por possuir, além da ação antioxidante (Roig-Pérez et al., 2004; Silva et al., 2011 e 2014), propriedades que modulam o fluxo de cálcio (Dukta et al., 2014), que auxiliam na estabilização da estrutura de membranas celulares (Tang, 2000), que regulam mediadores inflamatórios (Nakajima et al., 2010) e que inibem a apoptose celular (Takatani et al., 2004). Em conjunto essas ações atribuídas à taurina contribuem para a manutenção da homeostase celular.

Com base nesses pressupostos e devido a taurina possuir propriedades e funções biológicas regulatórias, acredita-se que a utilização da taurina como suplemento possa aumentar o grau de proteção celular facilitando o processo de reparação muscular. Entretanto, o mecanismo exato com que exerce essas propriedades ainda é inconclusivo.

1.1 LESÕES MUSCULARES

O aumento crônico da atividade contrátil do músculo esquelético, como por exemplo, durante o exercício físico, leva a uma variedade de adaptações fisiológicas e bioquímicas no tecido, incluindo biogênese mitocondrial, angiogênese e transformações nas miofibras ativas (Yan et al., 2011). Entretanto, esses movimentos repetitivos em esforço intenso e excessivo levam a lesões musculares (Barbe & Barr, 2006), as quais variam de menor dano com perda mínima da função muscular a danos maiores que implicam em complicações mais severas (Coburn, 2002).

A lesão na fibra muscular esquelética danifica os componentes do citoesqueleto celular ou levam a um dano no sarcolema gerando uma

perda da permeabilidade plasmática (Torres et al., 2013). Componentes intracelulares também são danificados como a membrana do retículo sarcoplasmático a qual compromete o fluxo de íons cálcio. Em decorrência, alterações bioquímicas intracelulares e consequente reações em cascata de uma resposta inflamatória são pronunciadas reduzindo a capacidade de contração e relaxamento da fibra muscular (Powers e Jackson, 2008). De acordo com Malliaropoulos et al. (2011) os músculos mais comumente afetados durante esforços repetitivos, como o exercício, são os isquiotibiais, quadríceps e gastrocnêmio, músculos estes biarticulares que estão sujeitos às forças de aceleração e desaceleração. Além das alterações funcionais comprometidas total ou parcialmente, as lesões musculares promovem microtraumatismos e microruptura da fibra muscular e micro-hemorragia promovendo uma rápida sequência de respostas inflamatórias, edema e consequente morte celular (Alfredo et al., 2009).

Independente da causa da lesão muscular a consequência estrutural é a mesma sobre o tecido. A morfologia normal do músculo esquelético é de suma importância para sua atividade contrátil. Em virtude da sua forma fibrilar, a célula muscular é caracterizada por filamentos multinucleados periféricamente com contração muscular voluntária. A lesão à fibra muscular leva a uma desestruturação de toda unidade funcional comprometendo a integridade do sarcômero, sarcolema e lâmina basal o que desencadeia um processo inflamatório e consequente reparo tecidual (Mbebi et al., 1999). O núcleo da fibra muscular que é localizado periféricamente, centraliza-se, em resposta às lesões das estruturas fibrilares, afetando a histoarquitetura muscular. Esse tipo de anormalidade contribui para alterações na contração muscular compatível com quadro de miopatias (Stewart et al, 2016). Esse processo somado a lesão capilar, induz a uma série de cascatas bioquímicas, incluindo o influxo de cálcio, liberação de citocinas e ativação de proteases bem como influenciam a permeabilidade vascular local e modulam o fluxo sanguíneo, a fim de acelerar uma resposta inflamatória com consequente formação de edema (Beaton et al., 2002).

Na tentativa de conter a lesão, o processo de recuperação do tecido se inicia a partir da formação de um tampão rico em fibrina formando uma barreira protetora que resultará em uma matriz provisória onde ocorrerão uma resposta Inflamatória, proliferação celular ou granulação e remodelação e maturação tecidual, que se constituem as fases do reparo tecidual (Beaton et al., 2002). A inflamação inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, ocorrendo a migração de neutrófilos para o local da lesão, tendo seu pico de

migração até 24 horas após o início da lesão. Os neutrófilos produzem radicais livres e a presença de macrófagos promove uma varredura dos resíduos metabólicos (Tidball & Villalta, 2010). Os macrófagos são recrutados para a região lesionada 24 a 48 horas após a lesão, antes dos fibroblastos atuarem com mais intensidade. Os macrófagos contribuem de maneira importante na secreção de citocinas e fatores de crescimento. Também auxiliam, estimulando a angiogênese, fibroplasia e síntese da matriz extracelular (Broughton et al., 2006).

O processo de regeneração e recuperação celular é regulado por vias de sinalização intracelular de proteínas que mantém o equilíbrio entre a síntese proteica muscular e degradação da proteína muscular. Entre estas vias, a ativação da mTOR (do inglês *mechanistic Target of Rapamycin*) é um passo essencial para a regeneração muscular (Ge et al., 2009). A mTOR é uma proteína quinase que atua como um importante regulador de processos biológicos, integrando o controle da síntese de proteínas e degradação de proteínas e, portanto, o crescimento celular, e quando ativada estimula a síntese proteica, principalmente através de três proteínas reguladoras chave: p70S6K (proteína quinase ribossomal), 4E-BP1 (fator de iniciação eucariótico de ligação 4E1 proteína) e eIF4G (fator de iniciação eucariótica 4G) (Laplante; Sabatini, 2012).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E EXERCÍCIO FÍSICO

Em condições normais, a geração de radicais livres e ERO é um fenômeno bioquímico celular importante no organismo, pois ao serem formadas essas espécies auxiliam na manutenção e regulação do estado redox por servirem como sinalizadores celulares, por promovem adaptações celulares, por estimularem a ativação de fatores de transcrição, por atuarem como bactericidas intracelulares, por regularem a função mitocondrial assim como outros eventos da homeostase celular (Halliwell e Gutridge, 2007). Embora a produção dessas espécies seja importante para a sobrevivência das células, a produção exacerbada com declínio simultâneo do sistema de defesa antioxidante pode levar a danos em biomoléculas como peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e fragmentação de ácidos nucleicos em um processo conhecido como estresse oxidativo (Fisher-Wellman et al., 2009; Varela-Carver et al., 2010; Stagos et al., 2015).

As causas do aumento da produção de ERO durante o exercício não são totalmente conhecidas. Embora vários mecanismos tenham sido identificados, ainda existe uma falta de compreensão de como cada um

deles contribui para a quantidade total de radicais livres produzidos e qual o papel desses mecanismos no estresse oxidativo (Vollaard et al., 2005). De acordo com König et al. (2001) evidências demonstram que o exercício físico aumenta a geração de ERO por vários sistemas. Dependendo do tipo de exercício, são propostos diversos mecanismos principais para a geração destas espécies. Três mecanismos são destacados durante exercícios intensos: elevado fluxo de elétrons na cadeia de transporte mitocondrial devido às demandas energéticas; ativação da xantina oxidase (XO) em processos que envolvam a isquemia-reperusão dado a intensa atividade contrátil; ativação NADPH oxidase resultante da exposição respiratória dado ao elevado consumo de oxigênio durante a resposta inflamatória.

Na mitocôndria, uma das formas de produção de ERO é devido ao escape de elétrons entre o complexo I e ubisemiquinona e entre ubisemiquinona e o complexo III gerando maior parte dos superóxidos produzidos (Drose & Brandt, 2012). A ativação de leucócitos, após o dano muscular, estimula a produção de ERO, em particular, os neutrófilos são as maiores fontes de produção de superóxido pela reação NADPH-oxidase. Essa formação ocorre a partir da transferência de elétrons para o oxigênio a partir da oxidação da NADPH (Jiang et al., 2011).

As reações catalisadas pela XO são consideradas uma das mais importantes fontes de ERO em processos de contrações musculares intensas as quais promovem constante isquemia e reperusão sanguínea. Durante a isquemia o ATP (Adenosina Trifosfato) é degradado em AMP (Adenosina Monofosfato) devido à demanda energética. Se o oxigênio for insuficiente, o AMP é continuamente degradado para hipoxantina que pode ser convertido para xantina e ácido úrico pela XO. A XO liga-se a um elétron da redução do oxigênio e forma o superóxido. A XO também pode ser convertida da forma reduzida (xantina desidrogenase) para forma oxidada por proteases intracelulares que pode ser ativada pelo cálcio (Chevion et al., 2003).

No músculo esquelético, o aumento observado na elevada produção de ERO a partir de diferentes estímulos, leva a uma disfunção contrátil resultando em fraqueza e fadiga muscular (Powers et al., 2011; Rahal et al., 2014; Yavari et al., 2015). Nesse caso, o estresse oxidativo promove a translocação para o núcleo de fatores de transcrição sensíveis às mudanças no estado redox, além da regulação dos mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Em resposta, os fagócitos infiltram-se nos tecidos que expressam estes mediadores e causam a proteólise nas células, danos

estruturais e lesão oxidativa (Banerjee et al., 2003, Giustarini et al., 2009; Gomes et al., 2012).

1.3 TAURINA

A taurina (Tau) ou o ácido beta-aminossulfônico é um aminoácido não essencial contendo enxofre na sua estrutura e encontrado no coração, sistema nervoso central, retina, leucócitos e principalmente no músculo (Bouckenooghe et al., 2006). A taurina foi primeiramente descoberta e isolada pelos pesquisadores germânicos Friedrich Tiedemanne e Leopold Gmelin em 1827 ao ser encontrado na bile de bois em altas concentrações (Birdsall, 1998). Seu nome originou-se do nome em latim da espécie *Bos taurus* onde foi descoberta. Foi considerado um nutriente importante para a nutrição humana somente em 1975, quando foi observado que neonatos alimentados com nutrição parenteral não eram capazes de manter os níveis plasmáticos e urinários normais de taurina, ao contrário de bebês alimentados com leite materno (Chesney, 1988).

A biossíntese da taurina ocorre a partir dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína, que passam por diversas reações de oxidação e transulfuração, associados a vitamina B6 (piridoxina) como cofator (Ripps & Shen, 2012). A síntese envolve duas enzimas diferentes, a primeira cisteína dioxigenase, responsável por promover a oxidação da cisteína a ácido cisteína sulfínico, esta é descarboxilada pela cisteína ácido sulfínico descarboxilase, produzindo hipotaurina que será finalmente oxidada em taurina (Bouckenooghe et al., 2006).

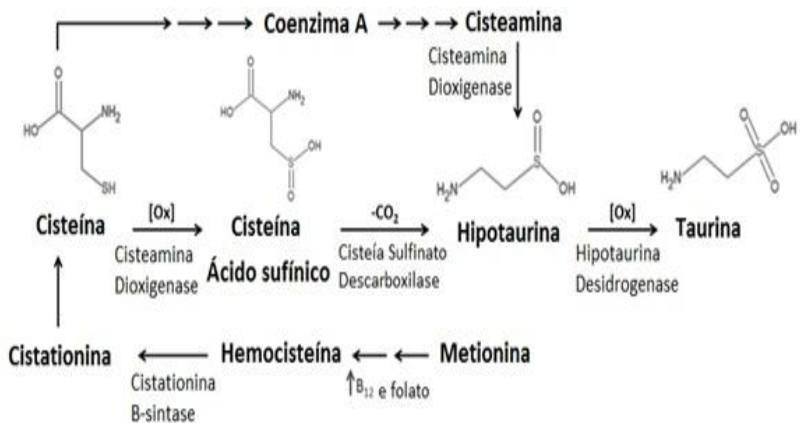


Figura 1 - Via de biossíntese da taurina.
Adaptado de De Luca et al. (2015).

A síntese de taurina no corpo humano ocorre principalmente no fígado a partir do metabolismo da metionina e cisteína. No entanto, a produção endógena é insuficiente, e a taurina deve ser também obtida através da dieta, principalmente pelo consumo de alimentos de origem animal e marinha (Szymański & Winiarska, 2008). É um dos poucos aminoácidos que não são utilizados na síntese proteica, muitas vezes, a taurina é referida como um aminoácido não essencial sulfuroso (Suwanich et al., 2013).

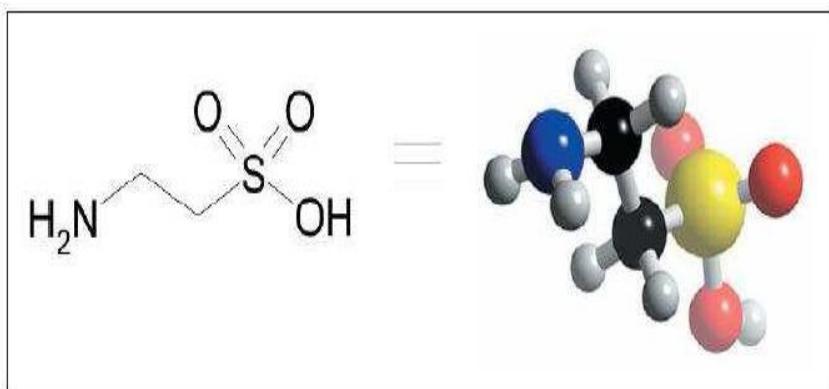


Figura 2 - Esquema ilustrativo da estrutura molecular (à esquerda) e estrutura atômica (à direita) da taurina.
Retirado de SZYMANSKI & WINIARSKA, 2008.

Apesar de não participar da estrutura de proteínas e enzimas, a taurina tem importante função reguladora no fluxo de cálcio, de proteção ao DNA, na síntese de proteínas mitocondriais (De Luca et al., 2015), na estabilização da estrutura de membranas celulares (Tang, 2000) e na regulação de mediadores inflamatórios (Nakajima et al., 2010; Marcinkiewicz & Kontny, 2014). Além disso, a taurina vem demonstrando um poderoso efeito antioxidante em diversos estudos (Roig-Pérez et al., 2004; Silva et al., 2011 e 2014).

Os mecanismos citoprotetores na inflamação e contra a ação de radicais livres consiste na capacidade da taurina em neutralizar a ação do ácido hipocloroso (HOCl), um oxidante potente, gerando a taurina-cloramina (TauCl) pela reação com HOCl produzido pelo sistema mieloperoxidase (MPO), que é mais estável e menos tóxico (Wójcik et al., 2010).

A TauCl é liberada a partir de neutrófilos ativados na sequência da sua apoptose e inibe a produção de mediadores inflamatórios, tais como, ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), óxido nítrico, fator de necrose tumoral, interleucinas (IL-6, IL-8, IL-12), prostaglandinas e enzimas proteolíticas (Kang & Kim, 2013; Kim & Cha, 2014). Em seu papel antioxidante, a TauCl aumenta a expressão de proteínas de detoxificação celular, possivelmente pela ativação do fator nuclear eritróide (Nrf2) que possui uma alta sensibilidade ao estresse oxidativo e promove a transcrição de uma grande variedade de genes antioxidantes, tais como heme oxigenase 1, NAD(P)H quinona desidrogenase, peroxiredoxina, tioredoxina, glutationa-peroxidase, catalase (Jin Sun et al., 2009; Jang et al., 2009; Kim et al., 2010). Em condições normais, o Nrf2 permanece no citosol a uma baixa concentração seguida por degradação proteossômica, porém em condições de estresse oxidativo ou por ação de quinases o Nrf2 é translocado para o núcleo a partir do desacoplamento do complexo *Kelchlike ECH-associated protein 1* (KEAP-1) na tentativa de manter a homeostase redox (Moi et al., 1994; Li et al., 2013; Chen et al., 2015). Segundo Hybertson et al. (2011), o Nrf2 é uma alternativa muito viável para a utilização de enzimas antioxidantes, ou de moléculas naturais ou sintéticas apresentadas para ter um papel "antioxidante" em virtude de suas habilidades para reagir estequiometricamente com oxidantes ou radicais livres.

Devido a taurina possuir propriedades e funções biológicas regulatórias sugere-se que ela possa contribuir para a modulação do estado redox de músculos lesionados pelo exercício físico, porém o mecanismo exato com que a taurina exerce essas propriedades ainda é inconclusivo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos regulatórios da taurina na modulação de parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo em lesão muscular induzida por um modelo experimental de *overuse*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar os efeitos modulatórios da taurina sobre as alterações histológicas e morfométricas de músculos de camundongos expostos a um modelo experimental de *overuse*.
- b. Avaliar os efeitos regulatórios da taurina sobre os danos em DNA em músculos de camundongos expostos a um modelo experimental de *overuse*.
- c. Avaliar os efeitos regulatórios da taurina sobre a função mitocondrial muscular de camundongos expostos a um modelo experimental de *overuse*.
- d. Avaliar os efeitos regulatórios da taurina sobre a atividade e conteúdo de proteínas regulatórias da síntese proteica muscular de camundongos expostos a um modelo experimental de *overuse*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício (Lafibe), localizado na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e vinculado ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde desta instituição.

3.2 QUESTÕES ÉTICAS

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios e os procedimentos descritos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob o protocolo N° 061/2015-1.

3.3 AMOSTRA

Fizeram parte da amostra 26 camundongos Swiss machos (3 a 4 meses de idade, pesando entre 30 - 35 g), oriundos do Biotério da UNESC. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas, temperatura ambiente controlada entre $20 \pm 22^\circ \text{C}$, ciclo claro-escuro 12/12 h e com livre acesso, alimentados com dieta padrão para roedores e água *ad libitum*. Os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos: controle (n=6), *overuse* (n=6), *overuse* + taurina (n=7), taurina (n=7).

3.4 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO E SUPLEMENTAÇÃO

Inicialmente, todos os animais dos grupos treinados foram ambientados em uma esteira ergométrica por sete dias (10 m/min sem inclinação com duração de 10 min/dia). Após esse período de adaptação os animais foram submetidos por 21 dias consecutivos ao seguinte programa de treinamento: exercício baixa intensidade, T1 (inclinação de 10%, duração de 60 minutos com velocidade de 13 m/min), exercício moderado, T2 (inclinação de 10%, duração de 60 minutos com velocidade de 17 m/min), exercício de alta intensidade, T3 (inclinação de -16%, até a exaustão com velocidade de 17 m/min).

A exaustão foi considerada pela incapacidade dos animais de manter um ritmo constante (manter-se durante 30 segundos ou mais, na

parte inferior da raia de corrida). A taurina sintética (Sigma-Aldrich), 150mg/Kg (Das et al., 2010) foi administrada por via subcutânea no dorso dos animais imediatamente após o exercício de alta intensidade nos grupos *overuse*, taurina e *overuse* + taurina, e no grupo controle foi administrada salina por via subcutânea.

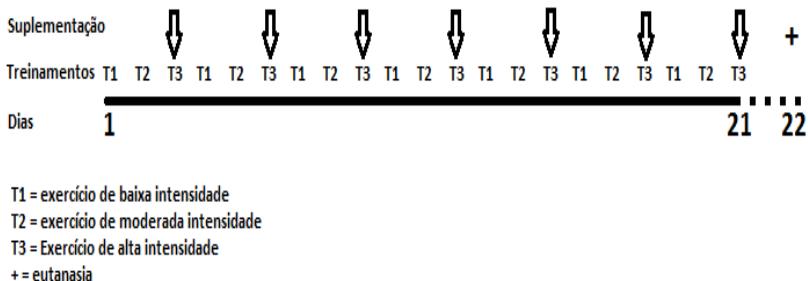


Figura 3. Desenho Experimental.

3.5 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Vinte e quatro horas após a última sessão de exercícios e administração da taurina, o sangue foi coletado pela veia caudal e após os animais foram eutanasiados por decapitação. Foi realizada a dissecação da porção central do quadríceps das pernas direita e esquerda. A porção do músculo quadríceps do lado direito foi dissecado e separado para histologia e o restante do material foi imediatamente processado, aliquotado e armazenado a -70°C para análises bioquímicas e moleculares subsequentes e os músculos do lado esquerdo do quadríceps foram imediatamente processados para isolamento mitocondrial. Uma alíquota do quadríceps direito foi homogeneizada em tampão específico e usado para análises de proteínas intracelulares por imunoblotting. O tecido foi homogeneizado em tampão contendo 1% de Triton X 100, 100 mM de Tris (pH 7,4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de vanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C . O homogeneizado foi então centrifugado a 11000 rpm por 40 minutos para remover materiais insolúveis. Com o sobrenadante determinou-se a concentração de proteína utilizando o método de Bradford et al. (1976) e posteriormente foi realizada a determinação do extrato total com anticorpo específico. O restante da amostra foi aliquotada e imediatamente armazenada em freezer -70°C para análises posteriores.

O descarte dos animais foi realizado com acondicionamento dos mesmos em saco branco leitoso e armazenado em freezer – 40° C para posterior tratamento e deposição final em aterro sanitário, conforme procedimentos estabelecidos pela Vigilância Sanitária (RDC 306/2004).

3.6 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIA

As mitocôndrias de músculo esquelético foram isoladas por centrifugação diferenciada conforme método descrito por Frezza et al., (2007). O tecido foi picotado, incubado por 10 minutos com protease tipo I de pâncreas bovino (1 mg/mL) e exposto a homogeneização para promover a lise celular. A precipitação do núcleo e resíduos celulares foi obtida por meio de uma centrifugação de baixa rotação (600 xg). As mitocôndrias foram então isoladas do sobrenadante por meio de centrifugações em elevadas rotações (12000 xg/10min) até a obtenção de uma suspensão homogênea que foi mantida em gelo até iniciar os experimentos.

3.7 HISTOLOGIA

Cortes transversais do músculo quadríceps foram removidos e imersos em solução fixadora de paraformoldeído 10% (PFA) tamponado por 48 hrs para posterior processamento histológico. O material foi incluído em parafina e cortado em micrótomo obtendo-se cortes de 5 µm de espessura. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina para posterior aquisição das imagens e análise histopatológica da histoarquitetura muscular. O grau de degeneração muscular foi avaliado através da quantificação da porcentagem de núcleos centralizados por número total de fibras musculares (50 fibras por lâmina histológica) em área teste de morfometria.

3.8 CONTEÚDO DE PROTEÍNAS

O conteúdo total de proteínas musculares para normalizar os resultados obtidos nos ensaios imunquímicos foi analisado através da curva padrão usando albumina bovina como padrão, de acordo com Bradford (1976).

3.9 ENSAIOS

Ensaio de genotoxicidade (ensaio Cometa): O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). Amostras de sangue dos animais foram coletadas em microtubos heparinizados e refrigeradas, e as amostras de fígado foram dissecadas e imersas em tampão fosfato (PBS) refrigerado, seguido por homegeinização manual com o auxílio de uma seringa, a fim de obter uma suspensão celular.

Alíquotas de 5 μL de sangue e 25 μL de fígado foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0,75%, w/v, 95 μL ou 75 μL , respectivamente) adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4° C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0 -10,5, com adição de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4° C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 2 semanas. Após este procedimento, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética foi realizada no mesmo tampão nas seguintes condições de 25 v e 300 mA por 15 minutos. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4 M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com nitrato de prata (Villela et al., 2006), para posterior análise em microscópio óptico com aumento de 400 x.

A análise foi feita visualmente com 50 células por tecido (em duplicada), classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda (Collins et al., 1997). O Índice de Danos (ID) foi determinado em cada amostra variando de zero (100 X 0 = 0; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100 X 4 = 400; 100 células observadas com dano máximo) enquanto que a Frequência de Danos (FD em %) em cada amostra foi observada com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda. As diretrizes e recomendações internacionais para o ensaio do cometa consideram que o escore visual de 70 cometas é confiável e possui alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins et al., 1997). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

Potencial de Membrana: 0,1 mg/ml de mitocôndria isolada foi incubada em tampão de respiração contendo (10 mM Tris HCl, pH 7,4,

0,32 M manitol, 8 mM fosfato de sódio, 4 mM MgCl₂, 0,08 mM EDTA, 1 mM EGTA e 0,2 mg/mL de albumina bovina livre de ácidos graxos). O corante catiônico safranina na concentração de 10 µM captado pela mitocôndria durante a formação do potencial de membrana. A máxima geração de potencial de membrana mitocondrial foi induzida com succinato e os resultados expressos como a diferença na absorbância do basal pelo succinato e succinato + ADP (Adenosina Difosfato). O potencial de membrana foi monitorado por fluorescência com comprimento de onda de 495 nm para excitação e 563 nm para emissão, em leitor de microplaca Spectra Max M3 (Molecular Devices) conforme descrito (Muller et al., 2013).

Complexos da Cadeia Respiratória Mitocondrial: A atividade do complexo I foi determinada de acordo com Cassina e Radi (1996), e é baseada na atividade da NADH desidrogenase pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm. A atividade do complexo I foi medida antes da adição de rotenona (20 g/mL) e a absorbância foi acompanhada durante outros 5 minutos. A atividade do complexo I foi determinada como atividade sensível à rotenona. A atividade do complexo II foi determinada de acordo com Fischer *et al.* (1985) a partir da diminuição na absorbância à 600 nm do 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP). A atividade do complexo IV foi determinada conforme método descrito por Rustin *et al.* (1994) a partir da diminuição da absorbância – 550 nm devido a oxidação do citocromo c pela citocromo c oxidase. As atividades dos complexos II, III e IV foram expressos como nmol/min mg proteína.

Produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio (H₂O₂): A produção de H₂O₂ foi determinada em mitocôndrias isoladas. Inicialmente, as mitocôndrias foram incubadas em tampão de respiração contendo (10 mM Tris HCl, pH 7,4, 0,32 M manitol, 8 mM fosfato de sódio, 4 mM MgCl₂, 0,08 mM EDTA, 1 mM EGTA e 0,2 mg/mL de albumina bovina livre de ácidos graxos) com adição 10 mM Amplex Red e 2 units/mL horseradish peroxidase. Após 10 min, ativadores mitocondriais (succinato - 1 mM e ADP – 10 µM) foram adicionados. A produção de H₂O₂ foi monitorada por fluorescência com comprimento de onda de 563 nm para excitação e 587 nm para emissão, em leitor de microplaca Spectra Max M3 (Molecular Devices) (Muller et al., 2013).

Western Blotting: as proteínas foram desnaturadas em aquecimento com tampão contendo 100 mM ditiotreitol (DTT). Posteriormente, 0,2 mg do extrato de proteína obtido de cada tecido foi

separado por eletroforese de proteínas (SDS-PAGE), etapa de corrida com duração de 1 hora 80 - 120 W. Imediatamente após, o conteúdo proteico foi transferido para uma membrana de PVDF, com 120V - 4°C - 1:15hs para posterior bloqueio com BSA 1% e posterior incubação com anticorpo primário anti-MyoD (1:1000), anti-miogenina (1:1000) obtido da Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA). Para controle interno, as membranas foram coradas com vermelho ponceau. Para a detecção quimioluminescente foi realizada com anticorpos secundários conjugados à peroxidase. As proteínas foram reveladas em filmes radiográficos e a intensidade das bandas foram detectadas por densitometria óptica usando um software de imagem (Scion Corporation).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio (EPM) e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido pelo teste post hoc de Bonferroni. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $p < 0,05$. Foi utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 21.0 como pacote estatístico.

4 RESULTADOS

A suplementação de taurina contribui para integridade e redução na quantidade de núcleos centrais em fibras musculares de quadríceps de camundongos submetidos ao modelo de *overuse*: Imagens representativas de cortes histológicos transversais do músculo quadríceps de animais expostos ao protocolo de *overuse* e tratados com suplementação de taurina corados com coloração de (H&E) foram mostrados. Na Fig 4A, o grupo controle apresentou morfologia das fibras musculares de aspecto normal com núcleo periférico (seta pontilhada). Na imagem do grupo *overuse*, Fig 4B, foi possível observar fibras musculares com núcleos centralizados (seta pontilhada) e com diminuição de área da fibra (seta contínua) compatível com hipotrofia muscular, ambos comparados com o grupo controle representado pela figura 4A. Nos grupos suplementados com taurina, o aspecto morfológico das fibras apresentava-se normal sem presença de núcleo centralizado, grupo taurina na figura 4C, incluindo o grupo *overuse* + taurina Fig 4D, comparados ao grupo *overuse*.

Quantificações quanto a porcentagem do número de núcleos centrais e da área da fibra foram realizados. Na Fig 4E, o grupo *overuse* demonstrou um aumento significativo do número de núcleos centrais/número de fibras comparado ao grupo controle e uma diminuição significativa da área da fibra muscular nos grupos tratados com taurina, incluindo o grupo *overuse* + Tau, comparados ao grupo *overuse*. Na Fig 4F, o grupo *overuse* demonstrou uma diminuição significativa da área da fibra comparado ao controle e um aumento significativo da área da fibra muscular nos grupos tratados com taurina, inclusive o grupo *overuse* + Tau, comparados ao grupo *overuse*.

Fig. 4 (A-D)

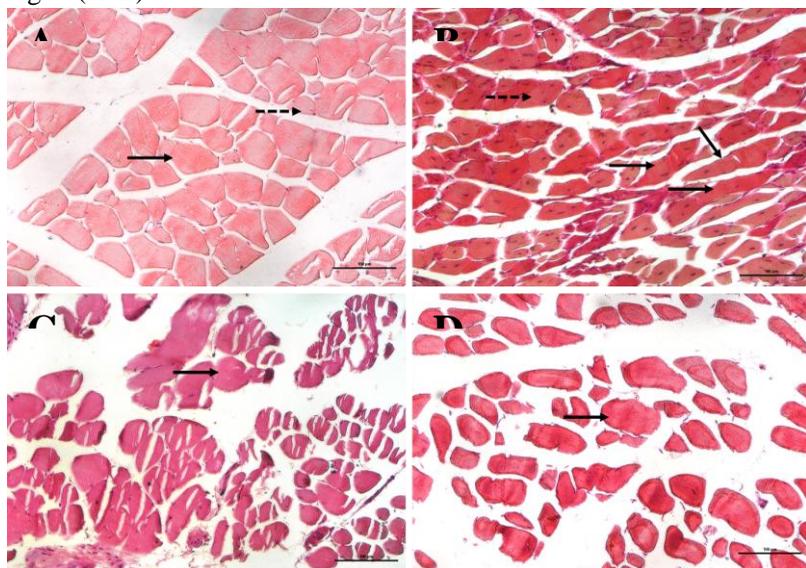


Fig. 4E

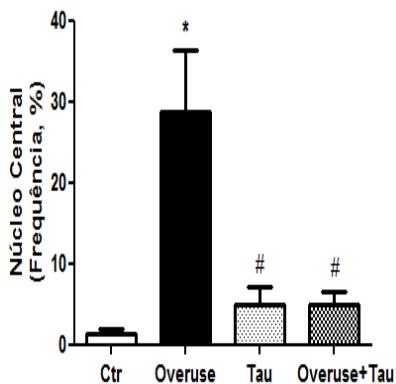


Fig. 4F

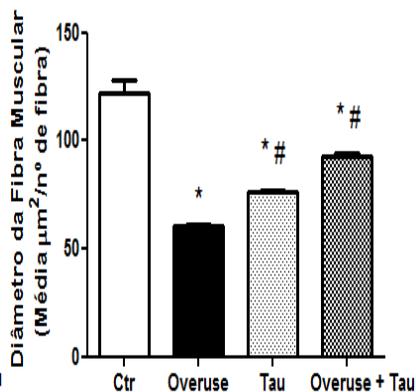


Figura 4. Cortes histológicos transversais do músculo quadríceps de animais expostos ao protocolo de *overuse* e tratados com suplementação de taurina foram corados com coloração de (H&E). As imagens representativas do músculo quadríceps apresentaram na Fig. 4A, o grupo controle, núcleo periférico evidenciado pela seta pontilhada. Fig. 4B, grupo *overuse*, seta pontilhada evidenciando a presença de núcleos centrais. Grupos taurina e *overuse* + taurina, Fig. 4C e D respectivamente, fibras musculares de aspecto normal foram indicadas

pela seta contínua. N=6/grupo, objetiva de 20x. A Fig. 4E e 4F representam quantitativamente a análise esterológica (4E, n=6) e morfológica (4F, n=6). A quantificação da presença de núcleo central e o diâmetro da fibra foram analisados pelo teste de Variância (Anova, *one-way*) seguido pelo post-hoc Bonferroni. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $p < 0,05$ quando os grupos foram comparados ao controle (*) ou ao grupo *overuse* (#). Foi utilizado o SPSS versão 21.0 como pacote estatístico.

A suplementação de taurina regula o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) sem alterar o fluxo de elétrons na cadeia respiratória: como observado na figura 5A, animais expostos ao *overuse* apresentaram um maior $\Delta\Psi_m$ quando as amostras foram estimuladas com succinato, porém, na presença de ADP, esses valores não foram reduzidos. Entretanto, animais suplementados com taurina apresentaram valores similares de $\Delta\Psi_m$ ao grupo controle. Adicionalmente, a atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons apresentou aumento no grupo exposto ao modelo de *overuse* sem redução quando suplementados com taurina (Fig. 5B). Os demais complexos (II e IV) não sofreram alterações significativas a partir do *overuse* e da suplementação de taurina (Fig. 5C e 5D).

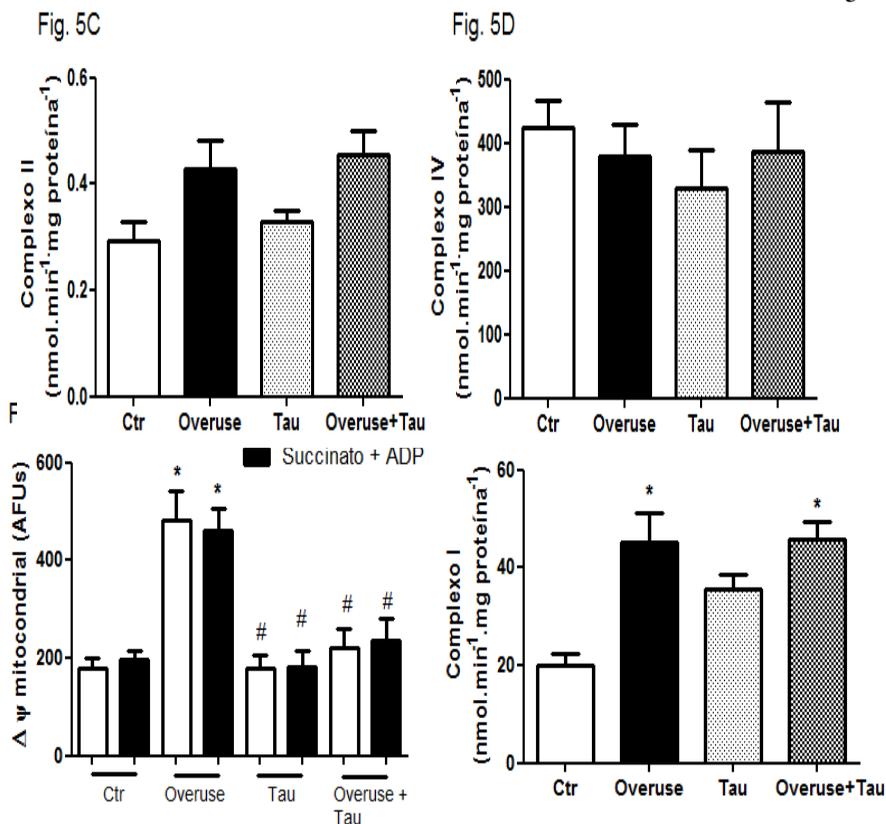


Figura 5. Análise da função mitocondrial do quadríceps de camundongos expostos ou não a um modelo experimental de *overuse* e suplementados ou não com taurina. O potencial de membrana (Fig. 5A) e os complexos I, II e IV (Fig. 5B-5D) foram analisados pelo teste de Variância (Anova, one-way) seguido pelo post-hoc Bonferroni. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $p < 0,05$ quando os grupos foram comparados ao controle (*) ou ao grupo *overuse* (#). Foi utilizado o SPSS versão 21.0 como pacote estatístico. Grupos: controle (Ctr), *overuse*, taurina (Tau), *overuse* + taurina (*overuse* + Tau)

Produção de H₂O₂ mitocondrial e dano oxidativo em lipídeos são atenuados após suplementação de taurina: Utilizando mitocôndrias isoladas de quadríceps dos animais expostos ao *overuse*, os níveis de H₂O₂ foram aumentados na presença de succinato e

significativamente reduzidos após adição de ADP em comparação ao grupo controle. Enquanto que, a suplementação de taurina no grupo *overuse* promoveu uma significativa redução nesses níveis quando as amostras foram estimuladas com succinato e um aumento quando adicionado o ADP (Fig. 6A). Os demais grupos não sofreram alterações significativas. Os danos oxidativos em lipídeos foram significativamente aumentados no grupo *overuse* e significativamente reduzidos no grupo *overuse* + taurina quando comparado ao grupo *overuse* (Fig. 6B). Porém, a oxidação de grupos tíóis não sofreram alterações significativas em todos os grupos testados (Fig. 6C).

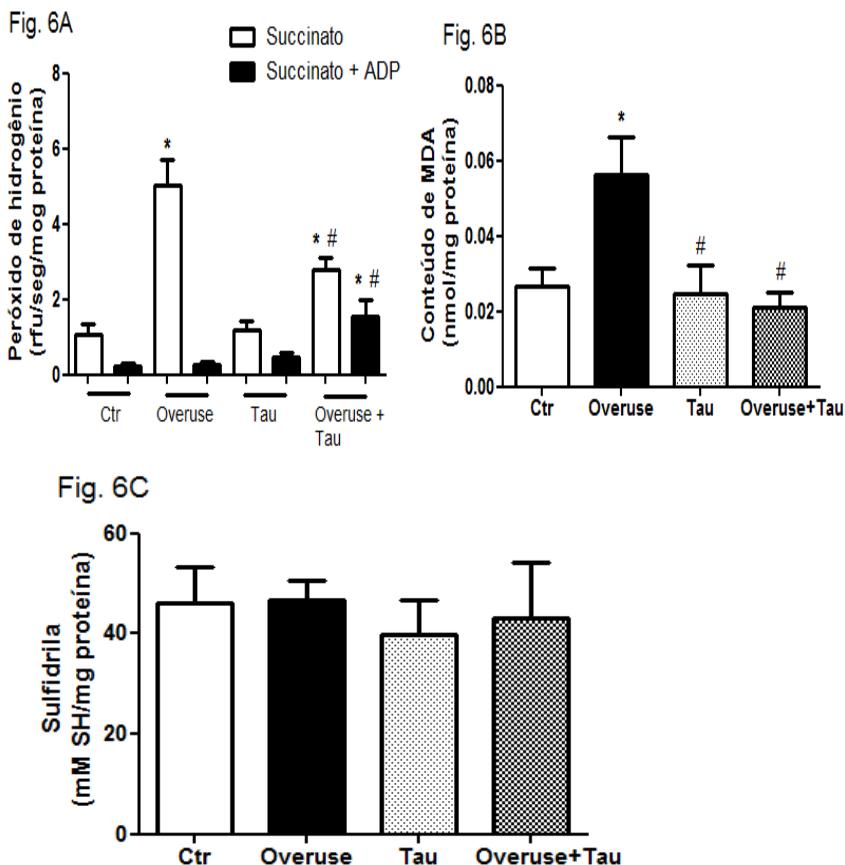


Figura 6 - Produção mitocondrial de H_2O_2 (Fig. 6A) e danos oxidativos em lipídeos (Fig. 6B) e proteínas (Fig. 6C) de quadríceps de camundongos expostos ou não a um modelo experimental de *overuse* e suplementados ou não com taurina. Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média e foram analisados pelo teste de Variância (Anova, one-way) seguido pelo post-hoc Bonferroni. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $p < 0,05$ quando os grupos foram comparados ao controle (*) ou ao grupo *overuse* (#). Foi utilizado o SPSS versão 21.0 como pacote estatístico. Grupos: controle (Ctrl), *overuse*, taurina (Tau), *overuse* + taurina (*overuse* + Tau).

Suplementação de taurina exerce efeitos regulatórios na reparação do tecido muscular: A MyoD e miogenina (MyoG) são proteínas envolvidas em diferentes fases de reparação do músculo esquelético. Os resultados apresentados nesse estudo mostram que o modelo de *overuse* não altera os níveis de MyoD (Fig. 7A) e MyoG (Fig. 7B), entretanto, a suplementação de taurina promove redução no nível da MyoG sem alterar o conteúdo de MyoD.

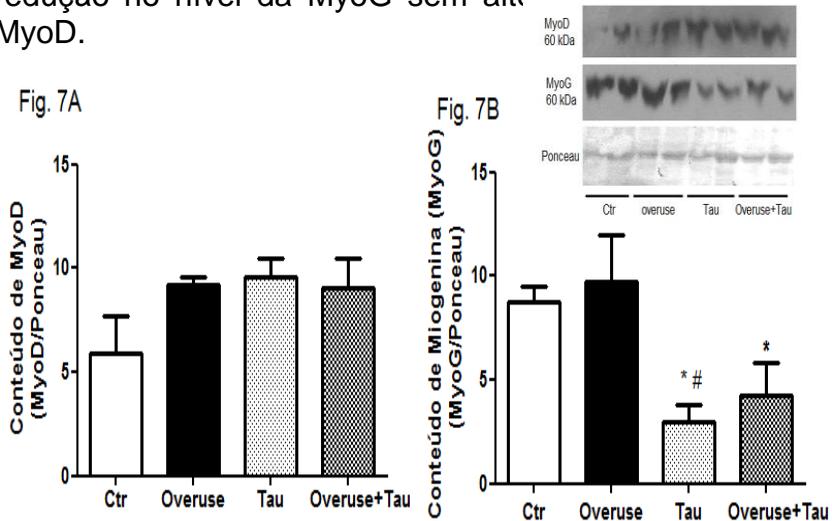


Figura 7. Proteínas envolvidas no reparo tecidual, MyoD (Fig. 7A) e MyoG (Fig. 7B), no quadríceps de camundongos expostos ou não a um modelo experimental de *overuse* e suplementados ou não com taurina. Os resultados absolutos foram relativizados pela quantidade de proteína determinada por Ponceu e estão expressos como média e erro padrão da média e foram analisados pelo teste de Variância (Anova, one-way) seguido pelo post-hoc Bonferroni. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $p < 0,05$ quando os grupos foram comparados ao controle (*) ou ao grupo *overuse* (#). Foi utilizado o SPSS versão 21.0 como pacote estatístico. Grupos: controle (Ctr), *overuse*, taurina (Tau), *overuse* + taurina (*overuse*+Tau).

Dano em DNA induzido pelo *overuse* muscular pode ser amenizado com a suplementação de taurina: a FD e o ID no DNA têm sido utilizados como parâmetros da genotoxicidade de tecidos. Neste sentido, os resultados do presente estudo demonstraram que o

overuse muscular repercute significativamente na genotoxicidade sanguínea observada a partir da FQ (Fig. 8A) e do ID (Fig. 8B). Entretanto, essas alterações induzidas pelo modelo de *overuse*, embora acima dos níveis de controle, estão significativamente reduzidas nos animais que receberam a suplementação de taurina.

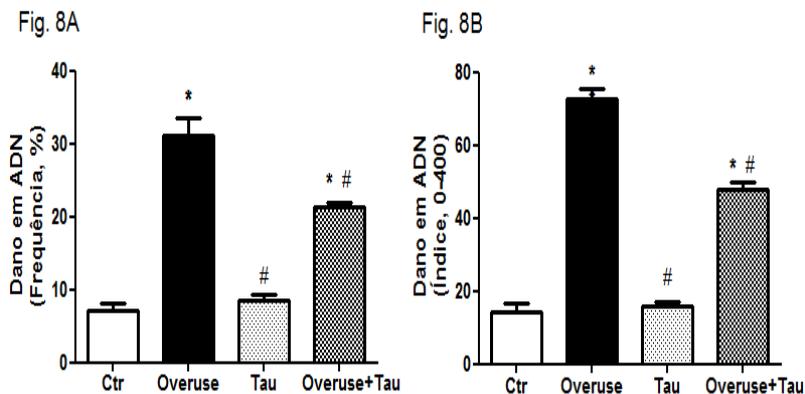


Figura 8 - Dano em DNA (Frequência de dano, Fig. 8A; Índice de dano, Fig. 8B) no quadríceps de camundongos expostos ou não a um modelo experimental de *overuse* e suplementados ou não com taurina. Os resultados absolutos foram relativizados pela quantidade de proteína determinada por Ponceu e estão expressos como média e erro padrão da média e foram analisados pelo teste de Variância (Anova, *one-way*) seguido pelo post-hoc Bonferroni. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $p < 0,05$ quando os grupos foram comparados ao controle (*) ou ao grupo *overuse* (#). Foi utilizado o SPSS versão 21.0 como pacote estatístico. Grupos: controle (Ctr), *overuse*, taurina (Tau), *overuse* + taurina (*overuse*+Tau).

5 DISCUSSÃO

O exercício físico intenso resulta no acúmulo de ERO nos músculos ativos podendo levar a danos em lipídios, proteínas e DNA nos músculos e outros órgãos e compromete diversas funções celulares indispensáveis para o reparo tecidual. Entretanto a duração, a intensidade, a frequência e o tipo de exercício são fatores que determinam a extensão dos possíveis danos oxidativos que podem ser produzidos (Brendan et al. 2013). O dano nas fibras musculares é acompanhado pelo recrutamento de células fagocíticas, como macrófagos e, embora este processo seja essencial para a reparação de tecido, envolve a liberação de quantidades substanciais de ERO. A magnitude desta liberação pode ser de tal maneira que resulte em danos adicionais na própria musculatura ou em tecidos adjacentes, prejudicando a funcionalidade muscular (McArdle et al., 2004).

Neste sentido, nos casos em que o exercício físico é o agente promotor das lesões oxidativas celulares por promover o aumento de ERO sem aumento concomitante dos sistemas de defesa antioxidante, uma intervenção bem-sucedida de antioxidantes pode contribuir para a redução do estresse oxidativo bem como melhorar o desempenho físico.

Com base nesses pressupostos, neste estudo, nós utilizamos um modelo experimental de *overuse* muscular em que camundongos foram submetidos a uma rotina de exercícios de intensidade baixa à alta durante 21 dias consecutivos e suplementados ao final do exercício de alta intensidade com taurina, um aminoácido não essencial que tem apresentado uma importante função antioxidante, bem como reguladora no fluxo de cálcio, de proteção ao DNA, na síntese de proteínas mitocondriais, na estabilização da estrutura de membranas celulares (Tang, 2000) e na regulação de mediadores inflamatórios (Nakajima et al., 2010; Marcinkiewicz & Kontny, 2014). Os resultados encontrados nesse estudo demonstram que a suplementação com a taurina exerce um papel importante no metabolismo redox do músculo esquelético sob condições de *overuse*, principalmente por reestabelecer a integridade da fibra muscular na fase de diferenciação miogênica da regeneração do quadríceps e por promover um reequilíbrio do estado redox.

A integridade do músculo esquelético é crucial para sua atividade contrátil voluntária. Em virtude da sua forma fibrilar, a célula muscular é caracterizada por microfilamentos e multinucleada perifericamente. Portanto, a centralização do núcleo da fibra muscular representa uma mudança na histoarquitetura intermiofibrilar que compromete a capacidade de contração e relaxamento. Esse tipo de

alteração contribui para a disfunção contrátil como apresentado em quadros de miopatias em humanos. Os resultados observados nos animais expostos ao *overuse* demonstraram um grande aumento no número de núcleos centrais na fibra muscular, além de uma diminuição da área da fibra (Fig. 4A-4D), característico da lesão e hipotrofia muscular, o que sugere um quadro compatível à miopatias. Lomonosova et al. (2014) também demonstraram mudanças nesses parâmetros em músculo de animais expostos ao exercício excêntrico.

Adicionalmente, a centralização nuclear em músculos esqueléticos está relacionada também com o déficit no sistema antioxidante. Os autores reportam que animais knock-out (-/-) para superóxido dismutase manganês (MnSOD) apresentam quadro de centralização de núcleo sugerindo que a resposta antioxidante exerce papel crucial sobre a integridade da fibra muscular (Lee.,2011).

Esses resultados de mudança na histoarquitetura muscular sugerindo uma resposta hipotrófica induzida pelo *overuse* foram significativamente alterados quando os animais receberam a administração de taurina no exercício. Os resultados demonstram que a taurina mantém a integridade da fibra com a presença de núcleos periféricos em níveis próximos aos de controle (Fig. 4E) bem como melhora o perfil morfológico por reestabelecer o diâmetro da fibra (Fig. 4F).

De acordo com estes dados, a taurina parece ter um papel importante sobre o remodelamento de lesões musculares causadas pelo modelo de *overuse*. As causas que favorecem esse remodelamento ainda não são amplamente conhecidas, mas alguns fatores como alteração nos níveis das proteínas de reparo, redução dos níveis de estresse oxidativo, melhora na função mitocondrial e redução do dano em DNA podem ajudar a explicar o papel da taurina nesse processo.

Nichenko e colaboradores (2016) mostraram que o remodelamento muscular depende da manutenção da atividade mitocondrial regulada positivamente por um processo de autofagia na fibra muscular. Sabe-se que células satélites ativadas durante as fases iniciais do mecanismo de reparo muscular contribuem para a regeneração muscular antecipadamente ao aparecimento do núcleo. Nesse caso, a demanda energética durante esse processo de regeneração muscular é dependente da fosforilação oxidativa. O que remete ao fato da manutenção da atividade mitocondrial ser imprescindível na regeneração e remodelamento muscular. A taurina, portanto, parece contribuir de forma positiva para o remodelamento muscular dado a sua capacidade de manutenção da função contrátil e melhora da atividade

antioxidante observado também em miopatias graves, reforçando os resultados obtidos no presente estudo.

A mitocôndria é uma organela altamente susceptível às lesões musculares induzidas pelo exercício intenso o que pode comprometer sua capacidade de funcionamento para a produção de energia bem como comprometer a recuperação do tecido (Lee et al., 2015; Nichenko et al., 2016). Durante o estresse celular, o $\Delta\psi_m$ e o gradiente de pH mitocondrial (ΔpH_m) ajudam a regular a mitocôndria sobre o metabolismo energético, homeostase iônica intracelular e morte celular em células (Chen, 1988). O $\Delta\psi_m$ por ser um dos mecanismos responsáveis por manter a função mitocondrial, e pode ser alterado por desregulação de cargas iônicas intracelulares comprometendo a produção de ATP (Seth et al., 2011).

Quando os fluxos iônicos ultrapassam a capacidade das mitocôndrias para tamponar estas alterações, levam a uma disfunção mitocondrial devido a uma falha bioenergética na síntese de ATP (Chen, 1988). Neste sentido, nossos resultados mostram que animais em *overuse* apresentaram um elevado $\Delta\psi_m$ significativamente maior do que os demais grupos, entretanto, quando as amostras foram estimuladas com succinato na presença de ADP, esses valores não foram reduzidos como esperado. O aumento observado no $\Delta\psi_m$ aponta para uma necessidade mitocondrial em produzir ATP, porém a dificuldade no desacoplamento faz com que a mitocôndria apresente uma capacidade fosforilativa reduzida, e desta forma, comprometendo a síntese de ATP. Esse fato contribui possivelmente para o extravasamento de elétrons nos complexos mitocondriais favorecendo uma maior produção de radicais livres (Muller et al., 2013).

Os animais suplementados com taurina apresentaram valores similares de $\Delta\psi_m$ ao grupo controle e nenhuma diferença foi observada quando o desacoplamento foi estimulado pelo ADP. Um dos fatores que possivelmente explicam esse resultado pode estar relacionado com a capacidade que a taurina possui em manter o equilíbrio iônico da matriz mitocondrial. Hansen et al. (2010) sugerem que a suplementação de taurina contribui para manutenção dos níveis mitocondriais de taurina o que permite o correto bombeamento de prótons sem promover uma alcalinidade da matriz, o que em certa instância, poderia levar a uma degradação mitocondrial. O papel regulatório da taurina sobre o metabolismo energético do músculo esquelético contribui para regular o processo de acoplamento excitação-contração celular (Ito et al., 2014). Adicionalmente, a manutenção do $\Delta\psi_m$ em relação ao grupo controle evita a formação de radicais semi-ubiquinona (Korshunov et al., 1997)

o que promove a uma deficiência significativa no extravasamento de elétrons reduzindo a formação de superóxido.

A mudança no $\Delta\Psi_m$ resulta em alterações na célula devido ao seu controle sobre a síntese de ATP, sobre a produção de superóxido e sobre o estado redox mitocondrial (Seth et al., 2011). Neste sentido, mudanças na atividade dos complexos da cadeia respiratória são esperadas quando há significativas mudanças no $\Delta\Psi_m$. Nossos resultados mostram que a atividade do Complexo I da cadeia transportadora de elétrons apresentou aumento no grupo exposto ao modelo de *overuse* independente da suplementação de taurina. Os demais complexos (II e IV) não sofrem alterações significativas. Esse resultado observado no complexo I pode ser decorrente de uma maior demanda de energia tecidual para que os processos de recuperação do tecido lesionado, observados na figura 4 (4A - 4F), possam acontecer. Entretanto, como o aumento na atividade do complexo I não é acompanhada pelos demais complexos, leva a sugerir que esteja acontecendo um possível bloqueio no fluxo de elétrons em subseqüentes fases da cadeia transportadora resultando numa limitada produção de ATP e concomitante aumento da produção de radicais livres.

A produção de radicais livres no músculo esquelético decorre de inúmeros estímulos intrínsecos e extrínsecos à fibra muscular que promovem mecanismos distintos, às vezes interdependentes, de produção de oxidantes como o aumento na atividade da NADPH oxidase em resposta aos estímulos inflamatórios, extravasamento de elétrons nos complexos I e III da cadeia respiratória decorrente de alterações no fluxo normal de elétrons e ativação da XO em processos de isquemia-repercussão (Powers et al., 2011). O aumento na produção desses radicais sem um concomitante e eficiente sistema antioxidante promove danos oxidativos em biomoléculas celulares como lipídeos, proteínas e DNA, caracterizando um quadro de estresse oxidativo (Halliwell e Guttridge, 2007) o que leva a uma disfunção contrátil muscular (Rahal et al., 2014; Yavari et al., 2015). Nossos resultados demonstraram que animais expostos ao *overuse* apresentaram níveis mitocondriais de H_2O_2 mais elevados em relação ao controle, mas a suplementação de taurina promoveu uma significativa redução nesses valores.

Como anteriormente mencionado a dificuldade de desacoplamento mitocondrial e aumento na atividade do complexo I sem aumento subseqüente dos demais complexos da cadeia respiratória levam a produção de superóxido por uma redução univalente do

oxigênio ou ao H_2O_2 a partir da transferência de dois elétrons ao oxigênio (Brand, 2016). Adicionalmente, o superóxido formado é dismutado pela MnSOD elevando os níveis mitocondriais de H_2O_2 (Halliwell e Gutteridge, 2007). De acordo com Brand (2016) a taxa de extravasamento de elétrons para gerar superóxido ou H_2O_2 não depende, em situações normais, da taxa de respiração ou da taxa de fluxo de elétrons da cadeia de transporte de elétrons. Entretanto, a medida em que o fluxo é alterado por estímulos nocivos à mitocôndria, que por sua vez altera o estado redox, como a concentração do doador de elétrons (NADH/NAD⁺), a produção desses ERO é aumentada.

Na suplementação de succinato e consequente oxidação mitocondrial, os níveis de superóxido e H_2O_2 são elevados a partir do complexo I e III durante o transporte de elétrons em que o fluxo de elétrons é reverso contra o gradiente de potencial redox favorecendo o extravasamento (Brand, 2016). A presença de ADP promoveu uma significativa redução de H_2O_2 no grupo *overuse*, possivelmente por aumentar a síntese de ATP e reduzir o gradiente de prótons (Komary et al., 2010). Contudo, animais suplementados com taurina, apresentaram níveis menores de H_2O_2 , porém o ADP, quando administrado na reação, não reduziu a produção de H_2O_2 . Provavelmente, esses resultados a partir da taurina sugerem que, em condições de lesão celular, níveis maiores de H_2O_2 em relação ao controle são necessários, pois o H_2O_2 serve também como sinalizador importante no processo de diferenciação celular.

Lee et al. (2011) demonstraram que durante a diferenciação celular, a atividade do complexo I encontra-se aumentada e é a principal responsável pela geração de $O_2^{\cdot-}$, rapidamente dismutado pela MnSOD. Por sua vez, a MnSOD é induzida pela ativação do fator de necrose tumoral β (NFK β) durante a miogênese, formando o H_2O_2 , que contribui de forma efetiva para o processo de diferenciação muscular (Lee et al., 2011).

A elevada produção de H_2O_2 mitocondrial observada nesse estudo, portanto, corrobora com os dados anteriores, de que H_2O_2 contribui com a diferenciação muscular. Adicionalmente, tende a promover danos oxidativos nas fibras musculares, tendo em vista que a produção de H_2O_2 em mitocôndrias de músculos esquelético responde por aproximadamente 96% do H_2O_2 citosólico (Boveris e Cadenas, 2000). Nossos resultados mostram que, embora a oxidação de grupos tióis totais não sofrerem alterações significativas, os danos oxidativos em lipídeos foram significativamente aumentados no grupo *overuse* e significativamente reduzidos no grupo *overuse* + taurina. Esses

resultados estão de acordo com estudos prévios recentes em que apontam que exercícios intensos aumentam danos oxidativos (Gao et al., 2014; Ceci et al., 2015) e que a taurina pode contribuir para redução do estresse oxidativo muscular (Silva et al., 2011 e 2014).

Outros estudos prévios relataram que a deficiência de taurina aumenta os níveis de MDA e que após a suplementação esses níveis são significativamente reduzidos (Kaplan et al., 1993; Öz et al., 1999). Silva et al. (2011) mostraram que o tratamento diário com 300 mg/kg de taurina por duas semanas protege o músculo contra o dano oxidativo em lipídeos induzido por lesão muscular decorrente do exercício excêntrico. Um dos principais efeitos da taurina sobre a redução dos danos oxidativos decorre de sua capacidade em reduzir a geração de oxidantes celulares (De Lucca et al., 2015). Wójcik et al., (2010) sugerem que, além de eliminar os radicais livres, a taurina neutraliza a ação do HOCl produzido a partir de respostas inflamatórias induzidas pela lesão muscular, gerando a taurina-cloramina (TauCl). O principal mecanismo sugerido é que a TauCl aumenta a expressão de proteínas de detoxificação celular, possivelmente pela ativação do Nrf2 que possui uma alta sensibilidade ao estresse oxidativo e promove a transcrição de uma grande variedade de genes antioxidantes (Jin Sun et al., 2009; Jang et al., 2009; Kim et al., 2010).

O remodelamento muscular após a lesão do tecido é dependente de inúmeros fatores que podem acelerar ou retardar esse processo. Vários componentes de vias de sinalização dependentes de cálcio e de vários fatores de transcrição e coativadores, além do estresse oxidativo, demonstraram estar envolvidas na remodelação do músculo esquelético (Bassel-Duby e Olson, 2006). Muitas das respostas de remodelamento envolvem a ativação de vias de sinalização intracelular e consequente reprogramação genética, resultando em alterações de massa muscular, propriedades contráteis e estados metabólicos (Potthoff et al., 2007). Neste sentido, a diferenciação muscular é um processo que envolve a expressão de fatores de transcrição miogênicos, como fator potencializador específico de miócito 2A (MEF2) e fatores miogênicos reguladores (MRFs), incluindo Myf5, MyoD, miogenina e MRF4 (Egan e Zierath, 2013).

Nossos resultados mostraram que o conteúdo de MyoD e MyoG não foram significativamente alterados pelo *overuse*, porém independente da lesão, a taurina promoveu uma redução no conteúdo de MyoG. Esse dado é intrigante uma vez que a MyoG é considerada como marcador precoce da fase de diferenciação muscular e é necessário para desencadear a formação de miotubos e

desenvolvimento muscular normal subsequente na fase final do processo miogênese muscular (Tidball e Villalta, 2010).

O papel da taurina sobre os fatores miogênicos não está amplamente esclarecido e esses resultados obtidos parecem contrários a estudos prévios. Isso porque a taurina exerce papel importante no desenvolvimento do músculo esquelético (Bassel-Duby e Olson, 2006). Uozumi et al., (2006) mostraram que o transportador de taurina (TauT) aumenta durante a miogênese e estimula a expressão de MEF2. A taurina também tem sido apontada por ter um papel importante na diferenciação de células musculares *in vitro* (Miyazaki et al., 2013). Contudo, estudos adicionais são necessários para entender os motivos pelos quais a taurina reduz a MyoG mesmo tendo contribuído para recuperação do tecido lesionado, como observado na Figura 7.

Nesse estudo ainda foram avaliados os efeitos do *overuse* sobre os danos em DNA sanguíneo, uma vez que em geral, os danos no DNA podem causar perturbações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, levando a processos apoptóticos e morte celular (Gottlieb 2000; Tada-Oikawa et al., 2000). Danos em DNA podem ser causados em resposta à ação de agentes endógenos e exógenos, tais como radiação ionizante, a qual pode induzir diretamente o dano, ou indiretamente, pela formação de ERO (Driscoll e Jeggo, 2006).

Os resultados obtidos mostraram que a frequência e o índice de dano no DNA foram elevados no sangue de animais expostos ao *overuse*, contudo essas alterações, embora acima dos níveis de controle, foram significativamente reduzidas nos animais expostos ao modelo de *overuse* que receberam a suplementação de taurina.

A taurina, por contribuir com a redução de oxidantes celulares (Parildar et al., 2008; Ma et al. 2010; Silva et al., 2011) promove proteção contra danos em DNA. Estudos prévios reforçam esse papel da taurina. Ma et al., (2010) relataram que a taurina promove reduções e danos de DNA causados por arsênio, através da via de sinal RNS *in vivo*. Similarmente Sugiura et al., (2013) observaram que a administração de taurina antes do exercício intenso reduz o dano ao DNA muscular provavelmente através da redução na atividade da síntese óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e consequente redução da inflamação por estresse nitrosativo.

Portanto, os efeitos protetores da taurina são consequência de um possível efeito modulatório devido a suplementação, provavelmente em relação à sua absorção e níveis intracelulares do músculo.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que a suplementação de taurina pode atuar em diversos parâmetros celulares envolvidos no remodelamento após a lesão muscular por *overuse*, e essa resposta positiva da taurina possivelmente está diretamente associada à sua capacidade antioxidante. No entanto, são necessários mais estudos para elucidar melhor o papel da taurina, principalmente no que se refere a função mitocondrial e às proteínas de reparo tecidual.

REFERÊNCIAS

- Alfredo P.P., Anaruma C. A., Pião A.C., João S.M., Casarotto R.A. Effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: an experimental study. **Ultrasonics**. 2009;49:466-71.
- Banerjee A. K., Mandal A., Chanda D., Chakraborti S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Mol Cell Biochem**. 2003; 253:307-12.
- Barbe M.F., Barr A..E. Inflammation and the pathophysiology of work-related musculoskeletal disorders. **Brain Behav Immun**. 2006;20:423-9.
- Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annu Rev Biochem**. 2006;75:19-37.
- Beaton L. J., Tarnopolsky M. A., Phillips S. M. Contraction-induced muscle damage in humans following calcium channel blocker administration. **J Physiol**. 2002; 544:849-59.
- Birdsall T. C. Therapeutic applications of taurine. **Altern Med Rev**. 1998; 3:128-36.
- Bouckenoghe T., Remacle C., Reusens B. Is taurine a functional nutrient? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. 2006; 9:728-33.
- Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubiquinone. **IUBMB Life**. 2000 Oct-Nov;50:245-50.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 1976; 72:248-54.
- Brand M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. **Free Radic Biol Med**. 2016; 5849:30021-1.
- Broughton G., Janis J.E., Attinger C.E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**. 2006; 117:12S-34S.
- Camus, G., G. Deby-Dupont, C. Deby, A. Juchmes-Ferir, J. Pincemail and M. Lamy Inflammatory response to strenuous muscular exercise in man. **Mediators Inflamm** 1993 2: 335-342.
- Cassina A., Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Arch Biochem Biophys**. 1996;328:309-16.
- Ceci R., Beltran Valls M. R., Duranti G., Dimauro I., Quaranta F., Pittaluga M., Sabatini S., Caserotti P., Parisi P., Parisi A., Caporossi D. Oxidative stress responses to a graded maximal exercise test in older

- adults following explosive-type resistance training. **Redox Biol.** 2014; 2:65-72.
- Ceci R, Duranti G, Sgrò P, Sansone M, Guidetti L, Baldari C, Sabatini S, Di Luigi L. Effects of tadalafil administration on plasma markers of exercise-induced muscle damage, IL6 and antioxidant status capacity. **Eur J Appl Physiol.** 2015 Mar;115:531-9.
- Chen B., Lu Y., Chen Y., Cheng J. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. **J Endocrinol.** 2015;225:R83-99.
- Chen LB. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Annu Rev Cell Biol.** 1988;4:155-81.
- Chen W., Guo J., Zhang Y., Zhang J. The beneficial effects of taurine in preventing metabolic syndrome. **Food Funct.** 2016; 20;7:1849-63.
- Chesney R. W. Taurine: is it required for infant nutrition? **J Nutr.** 1988; 118:6-10.
- Chevion S., Moran D. S., Heled Y., Shani Y., Regev G., Abbou B., Berenshtein E., Stadtman E. R., Epstein Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003; 100:5119-23.
- Coffey, V. G. and J. A. Hawley. The molecular bases of training adaptation. **Sports Med** 2007.37: 737-763.
- Coffey, V. G., A. Shield, B. J. Canny, K. A. Carey, D. Cameron-Smith and J. A. Hawley. Interaction of contractile activity and training history on mRNA abundance in skeletal muscle from trained athletes. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2006 290: E849-855.
- Collins A., Dusinská M., Franklin M., Somorovská M., Petrovská H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Raslová K., Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environ Mol Mutagen.** 1997; 30:139-46.
- Da Silva, L. A., C. B. Tromm, K. F. Bom, I. Mariano, B. Pozzi, G. L. da Rosa, T. Tuon, G. da Luz, F. Vuolo, F. Petronilho, W. Cassiano, C. T. De Souza and R. A. Pinho Effects of taurine supplementation following eccentric exercise in young adults. **Appl Physiol Nutr Metab** 2014 39: 101-104.
- Das J., Ghosh J., Manna P., Sil PC. Taurine protects acetaminophen-induced oxidative damage in mice kidney through APAP urinary excretion and CYP2E1 inactivation. **Toxicology.** 2010; 269:24-34.
- De Luca, A., S. Pierno and D. C. Camerino. Taurine: the appeal of a safe amino acid for skeletal muscle disorders. **J Transl Med** 2015; 13: 243.
- De Paula S. R., Raeder C., Wiewelhove T., Kellmann M., Meyer T., Pfeiffer M., Ferrauti A. Muscle mechanical properties of strength and

- endurance athletes and changes after one week of intensive training. **J Electromyogr Kinesiol.** 2016; 30:73-80.
- DiFiori J. P., Benjamin H. J., Brenner J., Gregory A., Jayanthi N., Landry G. L., Luke A. Overuse injuries and burnout in youth sports: a position statement from the American Medical Society for Sports Medicine. **Clin J Sport Med.** 2014; 24:3-20.
- Dröse S., Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Adv Exp Med Biol.** 2012; 748:145-69.
- Dutka T. L., Lamboley C. R., Murphy R. M., Lamb G.D. Acute effects of taurine on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ accumulation and contractility in human type I and type II skeletal muscle fibers. **J Appl Physiol** (1985). 2014; 117:797-805.
- Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metab.** 2013; 17:162-84.
- Fischer J. C., Ruitenbeek W., Berden J. A., Trijbels J. M., Veerkamp J.H., Stadhouders A. M., Sengers R. C., Janssen A. J. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin Chim Acta.** 1985; 153:23-36.
- Frezza C., Cipolat S., Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. **Nat Protoc.** 2007; 2:287-95.
- Fuller C. W., Ekstrand J., Junge A., Andersen T. E., Bahr R., Dvorak J., Hägglund M., McCrory P., Meeuwisse W. H. Consensus statement on injury definitions and data collection procedures in studies of football (soccer) injuries. **Clin J Sport Med.** 2006; 16:97-106.
- Gao C., Chen X., Li J., Li Y., Tang Y., Liu L., Chen S., Yu H., Liu L., Yao P. Myocardial mitochondrial oxidative stress and dysfunction in intense exercise: regulatory effects of quercetin. **Eur J Appl Physiol.** 2014; 114:695-705.
- Ge Y., Wu A. L., Warnes C., Liu J., Zhang C., Kawasome H., Terada N., Boppart M. D., Schoenherr C. J., Chen J. mTOR regulates skeletal muscle regeneration in vivo through kinase-dependent and kinase-independent mechanisms. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2009; 297:C1434-44.
- Giustarini D., Dalle-Donne I., Tsikas D., Rossi R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. **Crit Rev Clin Lab Sci.** 2009; 46:241-81.
- Gomes E. C., Silva A. N., de Oliveira M. R. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. **Oxid Med Cell Longev.** 2012; 2012:756132.

- Gottlieb R. A. Programmed cell death. **Drug News Perspect.** 2000;13:471-6.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free Radical in Biology and Medicine. 4th ed. **New York: University Press**; 2007.
- Hansen S.H., Andersen M. L., Cornett C., Gradinaru R., Grunnet N. A role for taurine in mitochondrial function. **J Biomed Sci.** 2010; 1:S23.
- Hasenoehrl T., Wessner B., Tschan H., Vidotto C., Crevenna R., Csapo R. Eccentric resistance training intensity may affect the severity of exercise induced muscle damage. **J Sports Med Phys Fitness.** 2016.
- Hubal, M. J., J. M. Devaney, E. P. Hoffman, E. J. Zambraski, H. Gordish-Dressman, A. K. Kearns, J. S. Larkin, K. Adham, R. R. Patel and P. M. Clarkson . CCL2 and CCR2 polymorphisms are associated with markers of exercise-induced skeletal muscle damage. **J Appl Physiol.** 2010; 108: 1651-1658.
- Hybertson B. M., Gao B., Bose S. K., McCord J. M. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. **Mol Aspects Med.** 2011; 32:234-46.
- Ito T., Yoshikawa N., Inui T., Miyazaki N., Schaffer S. W., Azuma J. Tissue depletion of taurine accelerates skeletal muscle senescence and leads to early death in mice. **PLoS One.** 2014; 17;9:e107409.
- Janecki D., Jarocka E., Jaskólska A., Marusiak J., Jaskólski A. Muscle passive stiffness increases less after the second bout of eccentric exercise compared to the first bout. **J Sci Med Sport.** 2011; 14:338-43.
- Järvinen T. A., Järvinen T. L., Kääriäinen M., Kalimo H., Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. **Am J Sports Med.** 2005; 33:745-64.
- Jiang F., Zhang Y., Dusting G. J. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. **Pharmacol Rev.** 2011; 63:218-42.
- Kang I. S., Kim C. Taurine chloramine administered in vivo increases NRF2-regulated antioxidant enzyme expression in murine peritoneal macrophages. **Adv Exp Med Biol.** 2013; 775:259-67.
- Kaplan B., Aricioglu A., Erbas D., Erbas S., Turkozkan N. The effects of taurine on perfused heart muscle malondialdehyde levels. **Gen Pharmacol.** 1993; 24:1411-3.
- Karpati, G., Carpenter S., Nelson R. F. Type I muscle fibre atrophy and central nuclei. A rare familial neuromuscular disease. **J Neurol Sci.** 1970; 10: 489-500.
- Kim C., Cha Y.N. Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects. **Amino Acids.** 2014; 46:89-100.

- Kim C., Jang J. S., Cho M. R., Agarawal S. R., Cha Y. N. Taurine chloramine induces heme oxygenase-1 expression via Nrf2 activation in murine macrophages. **Int Immunopharmacol.** 2010; 10:440-6.
- Klossner, S., C. Dapp, S. Schmutz, M. Vogt, H. Hoppeler and M. Fluck. Muscle transcriptome adaptations with mild eccentric ergometer exercise. **Pflugers Arch** 2007; 455: 555-562.
- Komary Z., Tretter L., Adam-Vizi V. Membrane potential-related effect of calcium on reactive oxygen species generation in isolated brain mitochondria. **Biochim Biophys Acta.** 2010;1797:922-8.
- König D., Wagner K. .H, Elmadfa I., Berg A. Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress. **Exerc Immunol Rev.** 2001; 7:108-33.
- Korshunov S. S., Skulachev V. P., Starkov A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **FEBS Lett.** 1997; 416:15-8.
- Kuwahara H., Horie T., Ishikawa S., Tsuda C., Kawakami S., Noda Y., Kaneko T., Tahara S., Tachibana T., Okabe M., Melki J., Takano R., Toda T., Morikawa D., Nojiri H., Kurosawa H., Shirasawa T., Shimizu T. Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. **Free Radic Biol Med.** 2010; 48:1252-1262.
- Laplante M., Sabatini D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell.** 2012. 149:274-93.
- Lawlor M. W., Beggs A. H., Buj-Bello A., Childers M. K., Dowling J. J., James E. S, Meng H., Moore S. A, Prasad S., Schoser B., Sewry C. A. Skeletal Muscle Pathology in X-Linked Myotubular Myopathy: Review With Cross-Species Comparisons. **J Neuropathol Exp Neurol.** 2016.
- Lee S., Kim M., Lim W., Kim T., Kang C. Strenuous exercise induces mitochondrial damage in skeletal muscle of old mice. **Biochem Biophys Res Commun.** 2015;461:354-60.
- Lee S., Tak E., Lee J., Rashid M. A., Murphy M. P., Ha J., Kim S. S. Mitochondrial H₂O₂ generated from electron transport chain complex I stimulates muscle differentiation. **Cell Res.** 2011; 21:817-34.
- Lomonosova Y. N., Shenkman B. S., Kalamkarov G. R., Kostrominova T. Y., Nemirovskaya T. L. L-arginine supplementation protects exercise performance and structural integrity of muscle fibers after a single bout of eccentric exercise in rats. **PLoS One.** 2014; 4:e94448.
- Ma N., Sasoh M., Kawanishi S., Sugiura H., Piao F. Protection effect of taurine on nitrosative stress in the mice brain with chronic exposure to arsenic. **J Biomed Sci.** 2010; 1:S7.

Malliaropoulos N., Isinkaye T., Tsitak K., Maffulli N. Reinjury after acute posterior thigh muscle injuries in elite track and field athletes. **Am J Sports Med.** 2011;39:304-10.

Mahoney, D. J., G. Parise, S. Melov, A. Safdar and M. A. Tarnopolsky. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. **FASEB J** 2005 19: 1498-1500.

Marcinkiewicz J., Kontny E. Taurine and inflammatory diseases. **Amino Acids.** 2014; 46:7-20.

Mbebi C., Hantaï D., Jandrot-Perrus M., Doyennette M. A., Verdière-Sahuqué M. Protease nexin I expression is up-regulated in human skeletal muscle by injury-related factors. **J Cell Physiol.** 1999; 179:305-14.

McArdle F., Spiers S., Aldemir H., Vasilaki A., Beaver A., Iwanejko L., McArdle A., Jackson M. J. Preconditioning of skeletal muscle against contraction-induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice. **J Physiol.** 2004; 561: 233–244.

Miyazaki T., Honda A., Ikegami T., Matsuzaki Y. The role of taurine on skeletal muscle cell differentiation. **Adv Exp Med Biol.** 2013; 776:321-8.

Moi P., Chan K., Asunis I., Cao A., Kan Y. W. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1994; 91:9926-30.

Muller A. P., Haas C. B., Camacho-Pereira J., Brochier A. W., Gnoatto J., Zimmer E. R., de Souza D. O., Galina A., Portela L. V. Insulin prevents mitochondrial generation of H₂O₂ in rat brain. **Exp Neurol.** 2013; 247:66-72.

Nakajima Y., Osuka K., Seki Y., Gupta R. C., Hara M., Takayasu M., Wakabayashi T.

Taurine reduces inflammatory responses after spinal cord injury. **J Neurotrauma.** 2010; 27:403-10

Neubauer O., Sabapathy S., Ashton K. J., Desbrow B., Peake J. M., Lazarus R., Wessner B., Cameron-Smith D., Wagner K. H., Haseler L. J., Bulmer A.C. Time course-dependent changes in the transcriptome of human skeletal muscle during recovery from endurance exercise: from inflammation to adaptive remodeling. **J Appl Physiol.** 2014; 116: 274-287.

Nichenko A. S, Southern W. M, Atuan M., Luan J., Peissig K. B., Foltz S. J, Beedle A. M., Warren G. L, Call J. A. Mitochondrial maintenance via autophagy contributes to functional skeletal muscle regeneration and remodeling. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2016; 00066 02016.

- O'Driscoll M., Jeggo P. A. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. **Nat Rev Genet.** 2006; 7:45-54.
- Öz E., Erbas D., Gelir E., Aricioglu A. Taurine and calcium interaction in protection on myocardium exposed to ischemic reperfusion injury. **Gen Pharmacol.** 1999; 33:137-141.
- Parildar H., Dogru-Abbasoglu S., Mehmetçik G., Ozdemirler G., Koçak-Toker N., Uysal M. Lipid peroxidation potential and antioxidants in the heart tissue of beta-alanine- or taurine-treated old rats. **J Nutr Sci Vitaminol** (Tokyo). 2008; 54:61-5.
- Paterno M. V, Taylor-Haas J. A, Myer G. D, Hewett T. E. Prevention of overuse sports injuries in the young athlete. **Orthop Clin North Am.** 2013; 44:553-64.
- Paulsen G., Benestad H. B., Strøm-Gundersen I., Mørkrid L., Lappegård K. T., Raastad T. Delayed leukocytosis and cytokine response to high-force eccentric exercise. **Med Sci Sports Exerc.** 2005; 37: 1877-1883.
- Perry S. W, Norman J. P., Barbieri J., Brown E. B., Gelbard H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. **Biotechniques.** 2011; 50:98-115.
- Pierson C. R, Tomczak K., Agrawal P., Moghadaszadeh B., Beggs A. H. X-linked myotubular and centronuclear myopathies. **J Neuropathol Exp Neurol.** 2005; 64: 555-564.
- Potthoff M. J., Olson E. N., Bassel-Duby R. Skeletal muscle remodeling. **Curr Opin Rheumatol.** 2007; 19:542-9.
- Powers S. K., Jackson M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Ver.** 2008; 88: 1243-1276.
- Powers S. K, Smuder A. J., Criswell D. S. Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy. **Antioxid Redox Signal.** 2011a; 15:2519-28.
- Powers S. K., Ji L. L., Kavazis A. N., Jackson M. J. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. **Compr Physiol.** 2011; 1:941-69.
- Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **Biomed Res Int.** 2014; 2014:761264.
- Ripps H., Shen W. Review: taurine: a "very essential" amino acid. **Mol Vis.** 2012; 18:2673-86.
- Roig-Pérez S., Guardiola F., Moretó M., Ferrer R. Lipid peroxidation induced by DHA enrichment modifies paracellular permeability in Caco-2 cells: protective role of taurine. **J Lipid Res.** 2004; 45:1418-28.

- Rustin P., Chretien D., Bourgeron T., Gérard B., Rötig A., Saudubray J. M., Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clin Chim Acta.** 1994; 228:35-51.
- Ryall, J. G. Metabolic reprogramming as a novel regulator of skeletal muscle development and regeneration. **FEBS J.** 2013; 280: 4004-4013.
- Schaffer S. W., Jong C. J., Ramila K. C., Azuma J. Physiological roles of taurine in heart and muscle. **J Biomed Sci.** 2010; 1: S2.
- Silva L. A., Silveira P. C., Ronsani M. M, Souza P. S, Scheffer D., Vieira L. C., Benetti M., De Souza C.T., Pinho R. A. Taurine supplementation decreases oxidative stress in skeletal muscle after eccentric exercise. **Cell Biochem Funct.** 2011; 29:43-9.
- Silva L. A., Tromm C. B., Da Rosa G., Bom K., Luciano T. F., Tuon T., De Souza C. T., Pinho R. A. Creatine supplementation does not decrease oxidative stress and inflammation in skeletal muscle after eccentric exercise. **J Sports Sci.** 2013; 31:1164-76
- Silva L. A, Tromm C. B., Bom K. F., Mariano I., Pozzi B., da Rosa G. L., Tuon T., da Luz G., Vuolo F., Petronilho F., Cassiano W., De Souza C. T., Pinho R. A. Effects of taurine supplementation following eccentric exercise in young adults. **Appl Physiol Nutr Metab.** 2014; 39:101-4.
- Stewart, M. D., S. Lopez, H. Nagandla, B. Soibam, A. Benham, J. Nguyen, N. Valenzuela, H. J. Wu, A. R. Burns, T. L. Rasmussen, H. O. Tucker and R. J. Schwartz. Mouse myofibers lacking the SMYD1 methyltransferase are susceptible to atrophy, internalization of nuclei and myofibrillar disarray. **Dis Model Mech** 2016 9: 347-359.
- Silveira P. C., da Silva L. A., Pinho C. A., De Souza P. S., Ronsani M. M., Scheffer D. L., Pinho R. A. Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. **Lasers Med Sci.** 2013; 28:431-6.
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.** 1988; 175:184-91.
- Stagos D., Goutzourelas N., Ntontou A. M., Kafantaris I., Deli C. K., Poullos A., Jamurtas A. Z., Bar-Or D., Kouretas D. Assessment of eccentric exercise-induced oxidative stress using oxidation-reduction potential markers. **Oxid Med Cell Longev.** 2015; 2015:204615.
- Stewart M. D., Lopez S., Nagandla H., Soibam B., Benham A., Nguyen J., Valenzuela N., Wu H. J, Burns A. R, Rasmussen T. L, Tucker H. O, Schwartz R. J. Mouse myofibers lacking the SMYD1 methyltransferase are susceptible

to atrophy, internalization of nuclei and myofibrillar disarray. **Dis Model Mech.** 2016; 9:347-59.

Sugiura H., Okita S., Kato T., Naka T., Kawanishi S., Ohnishi S, Oshida Y., Ma N. Protection by taurine against INOS-dependent DNA damage in heavily exercised skeletal muscle by inhibition of the NF- κ B signaling pathway. **Adv Exp Med Biol.** 2013; 775:237–246

Sun Jang J., Piao S., Cha Y. N., Kim C. Taurine Chloramine Activates Nrf2, Increases HO-1 Expression and Protects Cells from Death Caused by Hydrogen Peroxide. **J Clin Biochem Nutr.** 2009; 45:37-43.

Suwanich A., Wyss J. M., Roysommuti S. Taurine supplementation in spontaneously hypertensive rats: Advantages and limitations for human applications. **World J Cardiol.** 2013; 5:404-9.

Szymanski K., Winiarska K. Taurine and its potential therapeutic application. **Postepy Hig Med Dosw.** 2008; 62:75-86.

Tada-Oikawa S., Oikawa S., Kawanishi S. Determination of DNA damage, peroxide generation, mitochondrial membrane potential, and caspase-3 activity during ultraviolet A-induced apoptosis. **Methods Enzymol.** 2000; 319:331-42.

Takatani T., Takahashi K., Uozumi Y., Shikata E., Yamamoto Y., Ito T., Matsuda T., Schaffer S. W., Fujio Y., Azuma J. Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2004; 287: C949–953.

Tang Y., Schon E. A., Wilichowski E., Vazquez-Memije M. E., Davidson E., King M. P. Rearrangements of human mitochondrial DNA (mtDNA): new insights into the regulation of mtDNA copy number and gene expression. **Mol Biol Cell.** 2000; 11:1471-85.

Terrill J. R, Pinniger G. J., Graves J. A., Grounds M. D., Arthur P. G. Increasing taurine intake and taurine synthesis improves skeletal muscle function in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy. **J Physiol.** 2016; 594: 3095-3110.

Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C., Sasaki Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen.** 2000; 35:206-21.

Tidball J. G, Villalta S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2010; 298:R1173-1187.

Timmons, J. A. and I. J. Gallagher. Molecular studies of exercise, skeletal muscle, and ageing. **F1000Res** 2016 5.

- Torres R., Appell H. J., Duarte J. A. Acute effects of stretching on muscle stiffness after a bout of exhaustive eccentric exercise. **Int J Sports Med.** 2007; 28:590-4.
- Uozumi Y., Ito T., Hoshino Y., Mohri T., Maeda M., Takahashi K, Fujio Y., Azuma J. Myogenic differentiation induces taurine transporter in association with taurine mediated cytoprotection in skeletal muscles. **Biochem J.** 2006; 394:699–706
- Varela-Carver A., Parker H., Kleinert C., Rimoldi O. Adverse effects of cigarette smoke and induction of oxidative stress in cardiomyocytes and vascular endothelium. **Curr Pharm Des.** 2010; 16(23):2551-8.
- Villela I. V., de Oliveira I. M., da Silva J., Henriques J. A. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutat Res.** 2006; 605:78-86.
- Volllaard N.B., Shearman J. P., Cooper C. E. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. **Sports Med.** 2005; 35:1045-62.
- Wójcik O. P, Koenig K. L, Zeleniuch-Jacquotte A., Costa M., Chen Y. The potential protective effects of taurine on coronary heart disease. **Atherosclerosis.** 2010; 208:19-25.
- Yan Z., Okutsu M., Akhtar Y. N., Lira V. A. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985).** 2011; 110:264-74.
- Yavari A., Javadi M., Mirmiran P., Bahadoran Z. Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. **Asian J Sports Med.** 2015; 6:e24898.
- Zortéa D., Silveira P. C., Souza P. S., Fidelis G. S., Paganini C. S., Pozzi B. G., Tuon T., De Souza C. T., Paula M. M., Pinho R. A. Effects of phonophoresis and gold nanoparticles in experimental model of muscle overuse: role of oxidative stress. **Ultrasound Med Biol.** 2015; 41:151-62

ANEXO

ANEXO A. PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Lesão muscular pelo exercício físico: possíveis efeitos regulatórios da taurina associada à nanopartículas de ouro na modulação mitocondrial do sistema NADPH oxidase, regulação da homeostase do cálcio e estresse oxidativo”** Protocolo nº 061/2015-1 sob a responsabilidade de **Ricardo Aurino de Pinho** e equipe: Anand Thiru, Paulo Locks Silveira, Sharon Martins Freitas, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESCO – Universidade do Extremo Sul Catarinense, em reunião de: 02/06/2015.

Vigência do Projeto	03/06/2015 à 30/08/2017
Espécie/linhagem	Rattus norvegicus (Wistar)
Nº. De animais	48
Peso/idade	300 a 350g / 90 a 120 dias
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 061/2015-1

Principal Investigator: Ricardo Aurino de Pinho

Researchers: Anand Thiru, Paulo Locks Silveira, Sharon Martins Freitas

Project title: Muscle injury by exercise: possible regulatory effects of taurine associated with gold nanoparticles in the modulation of mitochondrial NADPH oxidase system, regulation of calcium homeostasis and oxidative stress

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 02 de junho de 2015.


JAIRO JOSÉ ZOCHE
Coordenador da CEUA