



UFOP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**UTILIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO HP β -CD ANGIOTENSINA-(1-7) COMO
ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO PREVENTIVO DAS LESÕES MUSCULARES
PÓS-EXERCÍCIO FÍSICO**

NÁDIA LÚCIA TOTOU

Ouro Preto – MG

2016

Nádia Lúcia Totou

**UTILIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO HP β -CD ANGIOTENSINA-(1-7) COMO
ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO PREVENTIVO DAS LESÕES MUSCULARES
PÓS-EXERCÍCIO FÍSICO**

Orientador: Wanderson Geraldo de Lima

Co-orientadora: Lenice Kappes Becker

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Ouro Preto – MG

2016

T717u Totou, Nádia Lúcia.
Utilização da formulação HPB-CD Angiotensina-(1-7) como estratégia de tratamento preventivo das lesões musculares pós-exercício físico [manuscrito] / Nádia Lúcia Totou. - 2016.
59f.: il.: color; grafs.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Geraldo Lima.
Coorientadora: Profa. Dra. Lenice Kappes Becker.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Lesão Muscular. 2. Inflamação. 3. Reumatismo não articular. 4. Angiotensina. I. Lima, Wanderson Geraldo. II. Becker, Lenice Kappes. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.74-002

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

"Utilização da formulação HP β -CD Angiotensina - (1-7) como estratégia de tratamento preventivo das lesões musculares pós-exercício físico "

Aos vinte e cinco dias do mês de fevereiro de 2016, às 10:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Nádia Lúcia Totou. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por aprovado a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.


Membros da Banca Examinadora:



Prof.ª Dr.ª Andréia Carvalho Alzamora
Examinadora (UFOP)



Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos
Santos
Examinadora (UFMG)



Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Presidente (UFOP)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Morfopatologia do Departamento de Ciências Biológicas, vinculado ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto e no Laboratório de Fisiologia do Exercício da Escola de Educação Física da Universidade Federal de Ouro Preto

Suporte financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Pró Reitoria de Pesquisa, Pós Graduação e Inovação/Proppi

Agradeço Especialmente...

A Deus, por me guiar e por sempre me possibilitar a realizar meus sonhos.

A meu orientador Wanderson Geraldo de Lima, agradeço pela oportunidade e por todos os ensinamentos. **À minha co-orientadora Lenice Kappes Becker**, por estimular meu interesse na pesquisa e por toda a base científica e me mostrar o melhor caminho a ser percorrido.

A Brenno, por ser o melhor namorado do mundo e por sempre me incentivar! Obrigada! Com você do lado, tudo fica mais fácil!

À minha família, que pediram a Deus por mim e que mesmo de longe, sempre se fizeram presentes.

Agradeço...

A Universidade Federal de Ouro Preto, por proporcionar um desenvolvimento científico, profissional e pessoal.

Aos Companheiros de Laboratório de Fisiologia do Exercício – LABFE e principalmente à Élida, Mariana e Angélica, pela ajuda, momentos de descontração por ocasião de algumas coletas e experimentos, tornando o trabalho menos árduo e por todos os momentos destinados à realização dessa dissertação. Agradeço especialmente à **Samara**, que com muita paciência, me ajudou incansavelmente durante esses dois anos de trabalho. Obrigada por toda a ajuda e companheirismo.

Às amigas, Tais de Carvalho e Marcela Dias, a amizade de vocês foi fundamental para vencer todo esse desafio.

Aos funcionários do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto, **Lilian, Kely e Lorena**.

Finalmente agradeço aos membros da Banca de Avaliação desta Dissertação, Professores Doutores **Robson Augusto Souza dos Santos e Andréia Carvalho Alzamora**, pelo aceite do convite e disponibilidade. Muito obrigada!

Resumo

No presente estudo avaliamos o efeito da administração oral com a formulação HP β -CD Angiotensina-(1-7) na prevenção de lesões musculares induzidas pelo exercício físico. Ratos Wistar, foram divididos em três grupos: Grupo previamente tratado com HP β -CD Angiotensina-(1-7), grupo previamente tratado com HP β -CD e grupo controle. Os animais dos grupos tratados foram submetidos a uma única sessão de exercício de contração excêntrica, realizado em esteira inclinada a -13° com velocidade constante de 20 m.min⁻¹. A administração com a HP β -CD Angiotensina-(1-7) (50 μ g/Kg) e com o veículo HP β -CD foi realizado três horas antes do protocolo de exercício e diariamente, em dose única, até o dia da eutanásia. A eutanásia aconteceu nos tempos: 04, 12, 24, 48 e 72 horas após a sessão de exercício, para acompanhar a evolução temporal do tratamento com a formulação. Foram coletadas amostras de sangue total, fragmentos dos tecidos musculares esqueléticos sóleo e gastrocnêmico para análises de creatina kinase (CK), interleucina – 6 e 10 (IL-6 e IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e análises histológicas de Hematoxilina e Eosina e *Picrosirius Red*. Nossos resultados mostraram que exercício de contração excêntrica e realizado de forma intensa levam ao dano muscular. Observamos aumento nos níveis séricos de CK, elevação nos níveis de citocinas pró (TNF- α e IL-6) e anti (IL-10) inflamatórias nos tecidos musculares sóleo e gastrocnêmio. Além disso, observamos aumento de células inflamatórias e deposição de tecido conjuntivo fibroso (colágeno tipo III) no tecido muscular visto por análises histológicas. O tratamento preventivo com HP β -CD Angiotensina-(1-7) foi capaz de reverter ou diminuir todo o processo observado nos animais tratados somente com HP β -CD. A administração de forma oral com a formulação de Angiotensina-(1-7) atenuou a liberação de CK na corrente sanguínea, diminuiu os níveis teciduais de TNF- α e IL-6, além de aumentar os níveis de IL-10. Por fim, observamos por meio de análises histológicas que o tratamento preventivo com a Angiotensina-(1-7) atenuou o infiltrado inflamatório e a deposição de colágeno tipo III, observadas principalmente nos tempos iniciais após o exercício físico intenso. Em conjunto, os resultados do presente estudo mostram que o tratamento com a formulação oral da Angiotensina-(1-7), tem papel fundamental em diferentes fases do processo de reparação da lesão muscular induzida pelo exercício físico. O acompanhamento temporal mostrou que a administração da formulação nos tempos iniciais pós-lesão são fundamentais no tratamento.

Palavras Chave: Lesão muscular, inflamação, fibrose, tratamento com Angiotensina-(1-7)

Abstract

In the present study we evaluated the effect of oral administration with HP β -CD formulation angiotensin-(1-7) in preventing muscle damage induced by exercise. Wistar rats were divided into three groups: Previously treated with HP β -CD angiotensin- (1-7) group, previously treated group HP β -CD and control group. Animals of the treated groups were subjected to a single eccentric contraction exercise session, held on a treadmill inclined to -13° a constant speed of $20 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$. The administration with HP β CD-angiotensin-(1-7) (50 mg / kg) and HP β -CD was performed three hours before exercise protocol and daily as a single dose, until the day of euthanasia. Euthanasia happened in the times: 4, 12, 24, 48 and 72 hours after the exercise session to monitor the evolution of the treatment with the formulation. Whole blood samples, fragments of skeletal soleus and gastrocnemius muscle tissues were collected for analysis of creatine kinase (CK), interleukin - 6 and 10 (IL-6 and -10) and tumor necrosis factor (TNF- α) and histological analysis of hematoxylin and eosin and Sirius Red. Our results showed that eccentric contraction and performed intensively exercise lead to muscle damage. We observed increased serum levels of CK elevation in pro cytokines (TNF- α and IL-6) and anti (IL-10) inflammatory soleus and gastrocnemius muscle tissue. In addition, there was an increase of inflammatory cells and deposition of fibrous connective tissue (collagen type III) in muscle tissue seen by histological analyzes. Preventive treatment with HP β -CD angiotensin- (1-7) was able to reverse or reduce the process observed in animals treated only with HP β -CD. The oral administration with the formulation of angiotensin- (1-7) attenuated the release of CK into the bloodstream, decreased tissue levels of TNF- α and IL-6, besides increasing IL-10 levels. Finally, we observed through histological analyzes that preventive treatment with angiotensin-(1-7) attenuated the inflammatory infiltrate and deposition of collagen type III, we observed mainly early times after intense exercise. Together, the results of this study show that treatment with the oral formulation of angiotensin-(1-7) plays a fundamental role in different phases of muscle damage repair process induced by exercise. The time monitoring showed that administration of the formulation at early times post-injury are fundamental in the treatment.

Keywords: Muscle injury, inflammation, fibrosis, treatment with angiotensin-(1-7)

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo temporal do plano experimental de trabalho.....	24
Figura 2. Massa Corporal dos animais do Grupo Controle e tratados com as formulações, ao início dos procedimentos experimentais	28
Figura 3. Níveis séricos de CK dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico.....	29
Figura 4. Níveis de TNF-α no músculo sóleo dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico.....	31
Figura 5. Níveis de IL-6 no músculo sóleo dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico.....	32
Figura 6. Níveis de IL-10 no músculo sóleo dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico.....	33
Figura 7. Número de células inflamatórias presentes no músculo sóleo dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico.....	34
Figura 8. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de músculo estriado esquelético sóleo de animais tratados com o veículo HPβ-CD e com formulação de HPβ-CD Angiotensina-(1-7) corados pela Hematoxilina e Eosina.....	35
Figura 9. Área correspondente a deposição de colágeno no músculo sóleo dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico.....	36

Figura 10. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de músculo estriado esquelético sóleo de animais tratados com o veículo HPβ-CD e com formulação de HPβ-CD Angiotensina-(1-7) corados pela técnica de Pircrosirius observados à luz polarizada.....	37
Figura 11. Níveis de TNF-α no músculo gastrocnêmio dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico	39
Figura 12. Níveis de IL-6 no músculo gastrocnêmio dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico.....	40
Figura 13. Níveis de IL-10 no músculo gastrocnêmio dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico.....	41
Figura 14. Número de células inflamatórias presentes no músculo gastrocnêmio dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico.....	42
Figura 15. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de músculo estriado esquelético gastrocnêmio de animais tratados com o veículo HPβ-CD e com formulação de HPβ-CD Angiotensina-(1-7) corados pela Hematoxilina e Eosina.....	43
Figura 16. Área correspondente à deposição de colágeno no músculo gastrocnêmio dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico.	44
Figura 17. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de músculo estriado esquelético gastrocnêmio de animais tratados com o veículo HPβ-CD e com o veículo de HPβ-CD Angiotensina-(1-7) corados pela técnica de Pircrosirius observados à luz polarizada.....	45

Lista de Abreviaturas

Ang II - Angiotensina II

Ang-(1-7) - Angiotensina-(1-7)

ARBs - Bloqueadores de receptor AT₁

AT₁ - Receptores Angiotensinérgico do Tipo 1

CCA - Centro de Ciência Animal

CK - Creatina Kinase

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina

ECA 2 - Enzima Conversora de Angiotensina 2

HE - Hematoxilina-Eosina

HPβ-CD – Hidroxipropil Beta Ciclodextrina

IFN-γ - Interferon gama

IL - 1β – Interleucina – 1 Beta

IL-10 – interleucina – 10

IL1-AR – Receptor Antagonista de Interleucina-1

IL-6 - Interleucina – 6

NK - natural *Killer*

sFNTRs – Receptores Solúveis de Fator de Necrose Tumoral

SRA - Sistema Renina Angiotensina

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

Sumário

Resumo.....	VII
Abstract.....	VIII
Lista de Figuras.....	IX
Lista de Abreviaturas.....	XI
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Estratégias	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Protocolo experimental	22
3.1.1 Animais do estudo	22
3.1.2 Preparo das formulações.....	22
3.1.3 -Tratamento com a formulação oral HPβ-CD-Ang-(1-7) e HPβ-CD	23
3.1.3 Protocolo de exercício físico	23
3.1.4 Protocolo de eutanásia	23
3.2 Determinação dos Níveis Totais de Creatina Kinase.....	24
3.3 Quantificação das citocinas teciduais	24
3.3.1 Processamento dos tecidos para quantificação de citocinas.....	25
3.3.2 Determinação dos níveis de citocinas.....	25
3.4 Análises Histológicas	26
3.5 Análises Estatísticas	26

4. RESULTADOS	28
4.1 Massa corpórea do animais	28
4.2 Avaliação dos níveis séricos de Creatina Kinase.....	29
4.3 Avaliação dos níveis teciduais de citocinas no músculo estriado esquelético sóleo	30
4.4 Avaliações histológicas do músculo estriado esquelético sóleo	33
4.6 Avaliações histológicas do músculo estriado esquelético gastrocnêmio.....	41
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

Lesões em tecidos musculares estriados esqueléticos são comuns em praticantes profissionais ou recreativos do esporte, afetando a performance e/ou a continuidade de qualquer modalidade esportiva. Em 90% dos acontecimentos, tais lesões ocorrem por contusão, distensão ou laceração (JARVINEN; LEHTO, 1993). Por essa razão, estratégias de prevenção e tratamento da lesão muscular induzida pelo exercício são fundamentais para que o atleta não seja afastado ou ainda possa retomar as atividades sem um longo período de recuperação. Os danos musculares podem ocorrer em diferentes magnitudes dependendo do tipo de exercício, velocidade de movimento e tipo de contração que o tecido estriado esquelético muscular sofre durante o exercício.

Exercícios físicos variados levam a diferentes tipos de contrações da musculatura estriada esquelética (FAULKNER; BROOKS; OPITECK, 1993). As contrações isométricas são caracterizadas pelo equilíbrio entre a tensão gerada sobre as fibras musculares e a carga imposta sobre ele em sentido oposto, não gerando variações no comprimento total da musculatura. As contrações concêntricas são caracterizadas por ciclos de alongamento e encurtamento das fibras musculares, devido à aplicação de uma força sobre o tecido maior que a resistência do mesmo (FAULKNER; BROOKS; OPITECK, 1993). Este tipo de contração pode ser observado em exercícios como as flexões de braço, quadril, troncos, dentre outros. As contrações excêntricas são caracterizadas por ciclos de alongamento das fibras musculares devido à aplicação de uma força muito maior do que a força desenvolvida pelo músculo (FAULKNER; BROOKS; OPITECK, 1993). Este tipo de contração pode ser observado em exercícios de corrida em planos declinados, dentre outros (KIM; LEE, 2015).

Embora a lesão traumática como contusão e ruptura seja mais grave que uma lesão causada pela contração excêntrica (NOSAKA *et al.*, 2007), os danos recorrentes dessa contração, podem ocasionar uma perda de força afetando a função muscular, o que pode levar a uma diminuição do rendimento no treinamento

físico. (NEWHAM; JONES; CLARKSON, 1987). Trabalhos na Literatura mostram que estímulos lesivos causados em exercícios físicos regulares que tem predominância de contrações excêntricas levam a limitações da força e reduções no desempenho muscular em modelos animais (PRASARTWUTH; TAYLOR; GANDEVIA, 2005) e também em seres humanos (TANABE *et al.*, 2015). Trabalho realizado por Qun *et al.*,(2014), por exemplo, mostrou através de análises histológicas que uma única sessão de exercício de *dowhill running* (corrida em plano declinado), com predominância de contração excêntrica, causou danos musculares em animais que não realizavam previamente nenhum tipo de exercício físico regular.

Os exercícios de contração excêntrica são considerados os mais lesivos e podem causar danos mais extensos às fibras musculares, resultando em maiores perturbações das fibras, rompimentos dos sarcolemas, permitindo que proteínas extravasem para a corrente sanguínea (LAZARIM *et al.*, 2009). As ações excêntricas em comparação com as concêntricas recrutam menor número de unidades motoras para o mesmo nível de força desenvolvida, o que leva a um estresse mecânico elevado nas fibras musculares que estão sendo utilizadas (MALM; LENKEI; SJÖDIN, 1999).

O rompimento das fibras musculares causa liberação no parênquima tecidual de proteínas intracelulares, que atingem a corrente sanguínea, levando a elevação de seus níveis plasmáticos. A proteína citoplasmática Creatina Kinase (CK) participa do metabolismo celular unicamente de células musculares estriadas, sendo, portanto, a sua presença na corrente sanguínea correntemente usada como marcador sérico de lesões em tecidos musculares cardíacos e esqueléticos (CLARKSON; EBBELING, 1988).

Uma vez lesionado, mecanismos fisiológicos são ativados visando o reparo dos tecidos. As ações de reparo envolvem etapas complexas tais como a liberação de mediadores químicos, recrutamento, ativação e proliferação celular, ativação de mecanismos de reparo que, ao final, visam, quando possível, a recuperação morfológica e funcional do tecido lesionado (CEAFALAN; POPESCU; HINESCU, 2014). As fases de reparo dos tecidos musculares estriados esqueléticos são similares as de vários outros tipos de tecido após uma lesão, sendo elas as

seguintes: degeneração/inflamação, reparação, fibrose e remodelação (CARLSON; FAULKNER, 1983).

Vários estudos têm demonstrado que o exercício excêntrico desencadeia uma resposta inflamatória local e sistêmica, caracterizado pela elevação na concentração de leucócitos circulantes, infiltração de neutrófilos e macrófagos para o parênquima tecidual e aumento tecidual e plasmático na produção de citocinas pró-inflamatórias (PEAKE; NOSAKA; SUZUKI, 2005).

Dentre os diversos mediadores químicos liberados em resposta ao dano muscular, podemos destacar o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), como citocina chave do processo inflamatório. Este mediador é produzido principalmente por macrófagos ativados, linfócitos e monócitos e sua elevação é vista em diversas condições patológicas como o câncer, a AIDS e septicemia (BINGHAM, 2002). Nos processos inflamatórios o TNF- α é associado ao surgimento de outras citocinas e, em baixas concentrações, age nas células endoteliais promovendo vasodilatação e secreção de citocinas que tem ação quimiotáxica em relação aos leucócitos, promovendo, desta forma, um processo inflamatório (VITALE; RIBEIRO FDE, 2007). Elevações crônicas de TNF- α em virtude de lesões musculares podem ocasionar perda de massa muscular, através da inibição da síntese proteína (WILLIAMSON; KIMBALL; JEFFERSON, 2005).

Interleucina – 6 (IL-6) é também uma citocina pró-inflamatória e sua produção está associada a maiores liberações de TNF- α (CHEN; HSIEH, 2001). Esta citocina é produzida por macrófagos ativados e linfócitos T, principalmente em condições de traumas e queimaduras (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000), aparece precocemente nos processos inflamatórios podendo ser detectada já 60 minutos após a indução, com picos entre quatro (04) e seis (06) horas, podendo perdurar por até 10 dias (GEBHARD *et al.*, 2000). A IL-6 é associada à maturação de neutrófilos e macrófagos e diferenciação de linfócitos T citotóxicos e células natural *Killer* (NK) (LIN *et al.*, 2000). Por outro lado, a síntese de proteínas receptoras solúveis como IL1-AR e sFNTRs levam a IL-6 a ter reconhecida ação anti-inflamatória em alguns tecidos (RAEBURN *et al.*, 2002). Embora dados na literatura apresentem

controvérsias sobre o papel desta citocinas, alguns autores têm demonstrado elevações de IL-6 em miofibrilas de tecidos musculares lesionados (CHEN; HSIEH, 2001).

A Interleucina – 10 (IL-10) é considerada uma citocina de caráter anti-inflamatório por inibir a síntese de proteínas inflamatórias como o TNF- α , IL-1 e IL-6. A IL-10 é produzida por macrófagos e monócitos ativados e tem também reconhecida ação na estimulação da proliferação de mastócitos, diminuição na produção IFN- γ pelas células NK (ZHANG; AN, 2007).

Juntamente com a instalação das etapas inflamatórias celulares posteriores a lesão tecidual, mecanismos associados ao reparo dos tecidos lesionados são ativados com objetivo da recuperação morfofuncional deste. Em pequenas lesões, autores apontam eventos como a ativação de populações quiescentes de células denominadas satélites na lâmina basal das fibras musculares como chave no processo de regeneração da musculatura lesionada (BISCHOFF, 1986). Em grandes lesões ou processos lesivos crônicos podem gerar acúmulo excessivo de tecido conjuntivo fibroso que, em última instância, é muitas vezes associado à perda da capacidade funcional dos tecidos musculares. O tecido conjuntivo depositado na área de lesão, inicialmente chamado de tecido de granulação, é essencialmente composto de fibras colágenas finas e pouco estruturadas (colágeno tipo III e IV). Com o tempo o processo de remodelamento leva a substituição do tecido de granulação por um tecido conjuntivo mais estrutural (predominância de colágeno tipo I) levando a retração e resistência da área cicatrizada (TIDBALL, 2011). Neste processo, embora ocorrida a recuperação tecidual, as áreas fibróticas não mantem a funcionalidade natural do tecido acometido, bem como mantém a área mais propícia a novas lesões (TIDBALL, 2011).

Dessa forma, várias medidas profiláticas têm sido pesquisadas a fim de atenuar os efeitos negativos das lesões musculares induzidas pelo exercício físico e diminuir os processos relacionados. Dentre elas podemos citar as intervenções nutricionais (KYPAROS *et al.*, 2011), farmacológicas (GARG; CORONA; WALTERS, 2014), massagem (GATTERER *et al.*, 2015), utilização de ultrassom (FILHO *et al.*, 2015) e crioterapias (HAUSSWIRTH *et al.*, 2011). Apesar de haver resultados

positivos através dessas intervenções, não há ainda um tratamento e ou estratégia de prevenção de lesões musculares induzida pelo exercício físico. Sabendo disso, faz-se necessária a utilização de recursos que reduzam o tempo de inaptidão de esportistas de alto rendimento lesionados.

Nesta perspectiva, o Sistema Renina Angiotensina (SRA) têm apresentado indícios de ser um importante interventor nos processos de lesões musculares. Muito embora o SRA seja conhecido tradicionalmente como o maior controlador da pressão arterial e modulador do balanço eletrolítico corporal, atualmente mostra-se também como um sistema que controla importantes funções no músculo esquelético, exercendo um papel fundamental na perfusão e no metabolismo local da musculatura esquelética (PUTHUCHEARY *et al.*, 2011). Tanto os componentes clássicos do sistema, como por exemplo, a Angiotensina II (Ang II), receptor angiotensinérgico do tipo 1 (AT₁) e a enzima conversora de angiotensina (ECA), quanto os novos componentes, como e a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), a Angiotensina-(1-7) (Ang (1-7)) e seu receptor Mas, foram identificados nos tecidos musculares estriados, mostrando, dessa maneira, que há um SRA local na musculatura esquelética (CABELLO-VERRUGIO *et al.*, 2015). Contrabalanceando o eixo AngII/ECA/receptorAT₁, o eixo ECA2/Ang(1-7)/receptor Mas exerce efeitos opostos às da Ang II tais como: inibição da proliferação celular, vasodilatação, efeitos anti-hipertroóficos, anti-fibróticos, anti-inflamatório e anti-hipertensivo (TALLANT; FERRARIO; GALLAGHER, 2005) (BENTER *et al.*, 1995).

A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo produzido pela ação da ECA2 que exerce efeitos contra regulatórios aos efeitos da Angiotensina II (FERRARIO; IYER, 1998; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS; ANDRADE, 2000). Pesquisas recentes mostram que o SRA está envolvido nos processos de trofias e reparação muscular (RIQUELME *et al.*, 2014). Animais que apresentam níveis plasmáticos elevados de Ang II apresentam perda de massa muscular e este efeito ocorre através do receptor AT₁. Resultados encontrados em animais mostram que a inibição dos receptores AT₁ facilita o recrutamento de células satélites com conseqüente diferenciação e crescimento celular (YOSHIDA; HUQ; DELAFONTAINE, 2014). Especificamente no tecido muscular, dados com animais mostram que a Ang-(1-7) possui papel

fundamental em diferentes fases do processo de reparo muscular (CABELLO-VERRUGIO *et al.*, 2015).

Alguns autores mostraram evidências de que a Ang-(1-7) modula negativamente a migração de leucócitos, expressão de citocinas, além da inibição de vias fibrogênicas (MCCOLLUM; GALLAGHER; TALLANT, 2012). Estudos realizados por Sukumaran *et al.*, (2011) mostraram que a ação dos bloqueadores de receptor AT₁ da Ang II, Telmisartan e Olmesartan, ativou o eixo ACE2/Ang-(1-7)/Receptor Mas e dessa forma, contribuiu com os efeitos anti-inflamatórios em um modelo de animal com miocardite autoimune. Juntamente com a ativação do eixo ACE2/Ang-(1-7)/Receptor Mas, foi observada redução nos níveis de mediadores pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-6, bem como um aumento da liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 (SUKUMARAN *et al.*, 2012).

Na musculatura esquelética, dados recentes mostram importantes efeitos da Ang-(1-7), inibindo os fatores deletérios induzidos pela Ang II, como perda de massa magra e função da musculatura, além de promover recrutamento de células satélites, acompanhado de regeneração muscular (CISTERNAS *et al.*, 2015; MENESES *et al.*, 2015).

Nos processos fibróticos a Ang-(1-7) está envolvida na proteção de tecidos contra danos crônicos, através de efeitos diretos sobre a fibrogênese tecidual (IWATA *et al.*, 2005). Acunã *et al.*, (2014), por exemplo, mostraram que a administração de Ang-(1-7) diminuiu a produção de componentes da matriz extracelular, além de melhorar a força muscular em modelo animal de distrofia. Aliado aos benefícios da Ang-(1-7) no músculo, Riquelme *et al.*, (2014) demonstraram que o aumento da expressão da ECA2 tem efeito anti-fibrótico na musculatura de animais com distrofia. Ademais, Morales *et al.*, (2015) demonstraram que o aumento de fibrose tecidual em modelo com distrofia de *Duchenne* era associado ao aumento do receptor Mas, na tentativa fisiológica de reverter os efeitos patológicos da doença. Todos esses dados em conjunto mostram que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas participa efetivamente de processos importantes de recuperação da musculatura esquelética.

Considerando que a lesão muscular induzida pelo exercício físico ainda precisa de estratégias eficazes no tratamento e ou prevenção e que a Ang-(1-7) desempenha um papel importante na inflamação e fibrose muscular, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da administração oral com a formulação de Ang-(1-7) na prevenção das lesões musculares induzidas pelo exercício físico de contração excêntrica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da formulação oral HP β -CD-Angiotensina-(1-7) no tratamento preventivo de lesões musculares induzidas pelo exercício físico de contração excêntrica em ratos Wistar.

2.2 Estratégias

- Avaliar o efeito do tratamento nos níveis séricos de creatina kinase (CK) ao longo de 72 horas após a sessão de exercício excêntrico;
- Avaliar os níveis teciduais de citocinas pró (TNF- α e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10) nos músculos sóleo e gastrocnêmio ao longo de 72 horas após o exercício físico;
- Avaliar o processo inflamatório e a fibrose tecidual nos músculos sóleo e gastrocnêmio ao longo de 72 horas após o exercício físico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Protocolo experimental*

3.1.1 Animais do estudo

Ratos machos Wistar, com peso entre 250 e 300 gramas, provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto, foram distribuídos ao acaso nos grupos experimentais: grupo tratado com a formulação [HP β -CD-Ang-(1-7)] (40 animais), grupo tratado apenas com o veículo HP β -CD (40 animais), estes grupos foram submetidos a uma sessão de exercício físico (*dowhill*). Grupo Controle foi composto de 10 animais não tratados e não exercitados. Todos os animais foram mantidos em caixas plásticas, sendo quatro animais por caixa. Receberam água e ração *ad libitum*, permanecendo durante todo o experimento em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas (das 6h:00 às 18h:00). Todos os procedimentos realizados foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa animal da Universidade Federal de Ouro Preto (protocolo nº 2014/03).

3.1.2 Preparo das formulações

A dose das soluções para tratamento foi padronizada em 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de massa corporal. Para tal, a massa corpórea de cada animal foi previamente determinada. A solução placebo de HP β -CD foi diluída em água filtrada no dia do tratamento. O volume total administrado para cada animal foi aproximadamente 400 μl , com acréscimo de 100 μl de água filtrada. A solução de HP β -CD Ang-(1-7) foi pesada, e diluída em água filtrada no dia do tratamento. O volume total administrado para cada animal foi aproximadamente 400 μl , com acréscimo de 100 μl de água filtrada.

3.1.3 -Tratamento com a formulação oral HPβ-CD-Ang-(1-7) e HPβ-CD

O tratamento com a formulação HPβ-CD-Ang-(1-7) e com o veículo HPβ-CD foi realizado diariamente, em dose única, até o dia da eutanásia. O protocolo de tratamento foi iniciado três (03) horas antes da submissão dos animais ao protocolo de exercício físico.

3.1.3 Protocolo de exercício físico

Os animais foram adaptados ao exercício de corrida em esteira, em uma sessão diária, cinco (05) minutos, à velocidade de $15\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, com inclinação de 0%. Após adaptação, no quarto dia, os animais tratados foram submetidos a uma (01) sessão de exercício agudo de contração excêntrica que foi realizado em uma esteira rolante para ratos. Nesta única sessão, os animais realizaram a corrida na esteira inclinada negativamente a 13° , em velocidade constante de $20\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, durante 60 minutos (KAWANISHI *et al.*, 2013).

3.1.4 Protocolo de eutanásia

Ao final do exercício, os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) e eutanasiados por decapitação. A eutanásia seguiu o seguinte protocolo: Oito (08) animais tratados com formulação HPβ-CD-Ang-(1-7) e oito (08) tratados com o veículo HPβ-CD foram eutanasiados quatro (04) horas após o término do protocolo de exercício. Este procedimento foi repetido às 12, 24, 48 e 72 horas após o término do exercício e também com os 10 animais do Grupo Controle. Durante a eutanásia foram coletadas amostras de sangue total, fragmentos dos tecidos musculares esqueléticos sóleo e gastrocnêmico das patas direitas e esquerdas.

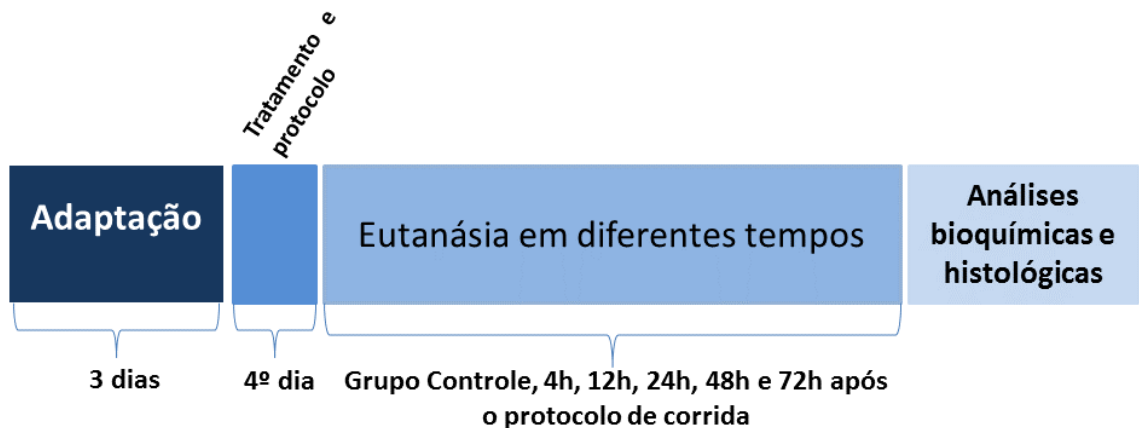


Figura 1. Modelo temporal do plano experimental de trabalho.

3.2 Determinação dos Níveis Totais de Creatina Kinase

Após eutanásia, foi obtida uma amostra de sangue para determinação quantitativa dos níveis totais da Creatina Kinase (CK) no Grupo Controle e nos grupos tratados nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício. As amostras foram centrifugadas a 4°C, por 10 minutos a 3.000 rpm e as alíquotas de soro foram estocadas a -20° para análises posteriores. Os níveis séricos das enzimas CK foram mensurados à temperatura aproximada de 37°C pelo método cinético enzimático, utilizando kit comercial CK-NAC Liquiform (Labtest Diagnóstica SA, Belo Horizonte, Minas Gerais). A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) com filtro para um comprimento de onda de 340 nm em intervalos de um (01) minuto, durante cinco minutos. Alteração na absorbância por minuto foi usada para determinar a atividade de CK.

3.3 Quantificação das citocinas teciduais

Os níveis de interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) foram determinados através de ensaio imunoenzimático (*Enzyme*

linked immunosorbent assay - ELISA), utilizando-se kits adquiridos da R&D Systems, Minneapolis, USA, conforme previamente descrito (ENGVALL, 1977; VOLLER; BARTLETT; BIDWELL, 1978), como a seguir:

3.3.1 Processamento dos tecidos para quantificação de citocinas

Para esta dosagem, foram utilizados fragmentos do músculo estriado esquelético coletado da pata esquerda dos animais. Adicionou-se 100 mg do músculo sóleo e do gastrocnêmio em 500 µl de solução de extração de citocinas [NaCl 0,4 mol/L, Na₂HPO₄ 10 mmol/L, PMSF 0,1 mmol/L, cloreto de benzalcônio 0,1 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tween 20 0,05% (p/v), BSA 0,5% (p/v), aprotinina 20 UI] para o processamento em homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Logo após, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm; 4°C; 30 minutos), o sobrenadante foi recolhido em tubos do tipo *ependorf* e congelado a -80°C.

3.3.2 Determinação dos níveis de citocinas

Todos os protocolos foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7.4, sendo que a sensibilização da placa ocorreu durante 18 horas à 4°C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% (p/v) de albumina bovina (Sigma) por 1 hora. As amostras, o padrão e o branco foram acrescentados aos seus respectivos poços. As placas foram incubadas a 4°C “overnight”. O anticorpo de detecção foi adicionado aos poços por 2 horas. A reação foi incubada com streptavidina conjugada com peroxidase (“HRP-Streptavidin Pharmingem”-1:4000) e revelada com dihidroclorato de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma). Após 30 minutos a reação foi interrompida com H₂SO₄. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm.

3.4 Análises Histológicas

Amostras das patas direitas dos músculos estriados esqueléticos sóleo e gastrocnêmio foram retirados, cortados em fragmentos não excedentes a dois (02) centímetros de espessura, foram fixados em solução de formalina tamponada por tempo mínimo de 72 horas.

As amostras fixadas foram submetidas a protocolos de rotina para análises histológicas, a saber: Foram desidratadas em série crescente de soluções alcoólicas (70°, 80°, 90° e 100°), diafanizados em xilol, embebidas e emblocadas em parafina. Secções parafinadas de aproximadamente cinco micrômetros (5 µm) de espessura foram obtidas através de técnicas de microtomia e fixadas em lâminas de vidro.

Para o processo de coloração, as secções histológicas foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em séries graduais de álcool (100°, 90°, 80° e 70°). A coloração Hematoxilina-Eosina (HE) foi realizada para uma observação geral das alterações histológicas e para determinação do processo inflamatório tecidual (SOARES *et al.*, 2011). A coloração de *Picrosirius red* foi utilizada para determinação do colágeno tecidual em microscopia óptica em luz polariza (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

Todas as avaliações quantitativas em ambos os métodos de coloração ocorreram após a obtenção de imagens de 15 campos diferentes e aleatórios dos tecidos corados com HE e *Picrosirius red* no microscópio Leica BM5000, com câmera digital (Leica DFC 300 FX) acoplada com módulo RGB ativada e associada ao software de captura de imagens Leica Application Suite. As imagens foram analisadas no software Leica Qwin V.3.2.1 (Leica Switzerland).

3.5 Análises Estatísticas

Para cada resultado foi realizado teste de normalidade. Para avaliação estatística dos dados que obtiveram a normalidade (massa corporal, CK e citocinas)

foi utilizado o teste da Tabela ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, neste caso, os dados foram expressos por média \pm erro padrão. Para os demais dados não normais foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's, e neste caso, os dados foram expressos pela mediana e percentis cinco (05) e 95%. As análises foram realizadas pelo programa *GraphPad Prism* (Versão 6.0, San Diego, USA). Para as diferenças estatísticas foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Massa corpórea dos animais

Ao início do experimento a massa corpórea dos animais foi aferida para certificação da homogeneidade dos grupos e para fins do cálculo do volume de administração das formulações de tratamento. Os resultados estão apresentados na Figura 2.

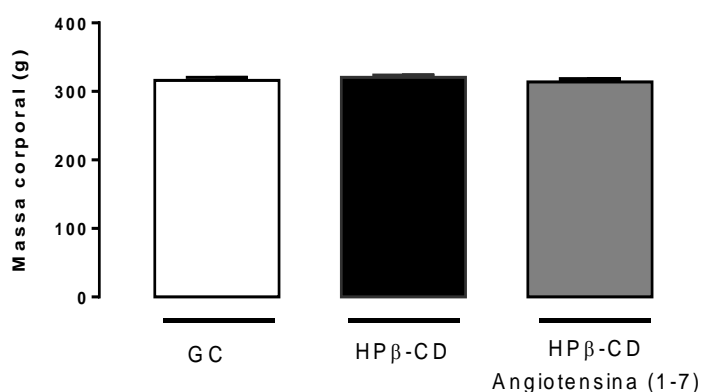


Figura 2. Massa Corporal dos animais do Grupo Controle e tratados com as formulações, ao início dos procedimentos experimentais. One Way-Anova. $p > 0,05$.

A massa corporal média dos animais controle ($316,2 \pm 4,5$ g) não apresentou diferença da massa corporal dos animais alocados nos grupos HPβ-CD ($314,0 \pm 3,4$ g) e dos animais do grupo tratado com HPβ-CD Ang-(1-7) ($320,6 \pm 3,4$ g). Da mesma maneira, não foram observadas diferenças nas massas corpóreas dos animais do grupo tratado com HPβ-CD comparadas às massas corpóreas dos animais do grupo tratado com HPβ-CD Ang-(1-7).

4.2 Avaliação dos níveis séricos de Creatina Kinase

Durante a eutanásia dos animais, foi obtida uma amostra de sangue dos animais, para avaliação dos níveis totais da enzima CK, como marcador sérico de lesões musculares, no Grupo Controle e nos grupos tratados nos tempos de quatro 04, 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício. Os resultados estão apresentados na Figura 3.

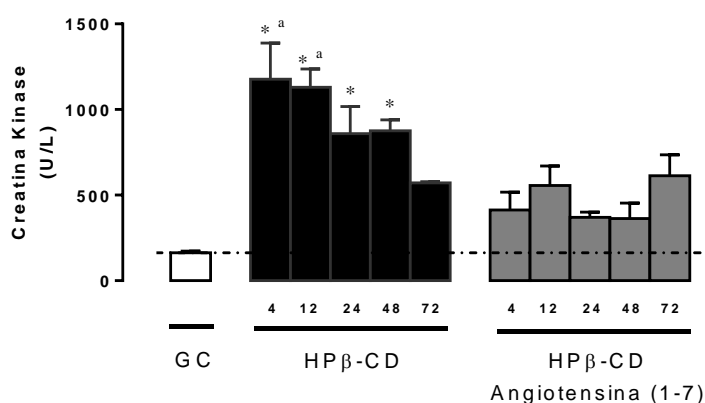


Figura 3. Níveis séricos de CK dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico. Asterisco (*) representa diferença significativa em relação ao GC ($p < 0,0001$). Letra (a) representa diferença significativa do grupo HPβ-CD em relação ao grupo HPβ-CD Angiotensina-(1-7) em mesmo tempo ($p < 0,0001$). One Way ANOVA, pós teste de Tukey.

Comparado aos animais do Grupo Controle ($163,3 \pm 9,7$ U/L), animais tratados com HPβ-CD apresentaram níveis elevados de CK sérica, nos tempos de quatro (04) (1177 ± 211 U/L), 12 ($1129 \pm 106,8$ U/L) e 48 ($876 \pm 63,3$ U/L) horas após o exercício físico. Ainda nestes grupos observamos que os valores de CK se equipararam ao grupo controle após 72 horas após o exercício. Por outro lado, animais tratados com HPβ-CD Ang-(1-7) apresentaram níveis séricos de CK semelhantes aos animais do Grupo Controle.

4.3 Avaliação dos níveis teciduais de citocinas no músculo estriado esquelético sóleo

Durante a eutanásia dos animais, foram obtidos fragmentos do músculo estriado esquelético sóleo para avaliação dos níveis de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) teciduais no Grupo Controle e nos grupos tratados nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício. Os resultados estão apresentados nas figuras 4, 5 e 6.

Comparado aos animais do Grupo Controle, animais tratados com HP β -CD apresentaram níveis elevados de TNF- α nos tempos de quatro (04) ($48,7 \pm 3,0$ pg/mg), 12 ($41,5 \pm 2,4$ pg/mg), 24 ($33,9 \pm 3,1$ pg/mg) e 48 ($29,2 \pm 2,6$ pg/mg) horas. Ainda neste grupo observamos que os valores de TNF- α se equipararam ao Grupo Controle 72 horas após o exercício. Da mesma forma, os animais do grupo tratado com HP β -CD Ang-(1-7) apresentaram níveis elevados de TNF- α nos tempos de quatro (04) ($23,7 \pm 2,4$ pg/mg), 12 ($27,0 \pm 1,8$ pg/mg), 24 ($28,4 \pm 2,6$ pg/mg) e 48 ($14,9 \pm 1,2$ pg/mg) horas em comparação com o Grupo Controle. Observamos que os níveis de TNF- α foram semelhantes 72 horas após o exercício físico (figura 4).

Comparado ao grupo tratado com HP β -CD Ang-(1-7), animais do grupo tratado com HP β -CD apresentaram níveis maiores de TNF- α nos tempos de quatro (04), 12, e 48 horas após o exercício físico. Ainda nestes grupos observamos que os níveis de TNF- α foram semelhantes nos tempos de 24 e 72 horas após o exercício físico.

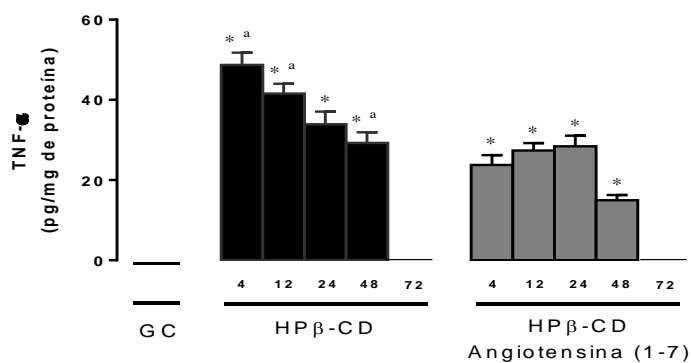


Figura 4. Níveis de TNF- α no músculo sóleo dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HP β -CD e HP β -CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico. Asterisco (*) representa diferença significativa em relação ao GC ($p < 0,0001$). Letra (a) representa diferença significativa do grupo HP β -CD em relação ao grupo HP β -CD Angiotensina-(1-7) em mesmo tempo ($p < 0,0001$). One Way ANOVA, pós teste de Tukey.

Em relação aos níveis de IL-6, os animais do grupo tratado com HP β -CD exibiram valores aumentados quando comparado ao Grupo Controle em todos os tempos observados, quatro (04) ($122,0 \pm 6,9$ pg/mg), 12 ($155,8 \pm 11,2$ pg/mg), 24 ($123,3 \pm 3,9$ pg/mg), 48 ($117,3 \pm 5,8$ pg/mg) e 72 ($130,3 \pm 6,9$ pg/mg). Da mesma forma, os animais do grupo tratado com HP β -CD Ang-(1-7) apresentaram níveis elevados de IL-6 nos tempos de quatro (04) ($100,0 \pm 4,7$ pg/mg), 12 ($117,0 \pm 9,0$ pg/mg), 24 ($103,6 \pm 3,9$ pg/mg), 48 ($93,8 \pm 7,0$ pg/mg) e 72 ($97,2 \pm 7,1$ pg/mg) horas em comparação com o Grupo Controle (figura 5).

Animais do grupo tratado com HP β -CD apresentaram níveis maiores de IL-6 12 horas após o exercício em comparação com os animais tratados com HP β -CD Ang-(1-7). Observamos que os níveis de IL-6 foram semelhantes nos demais nos demais tempos.

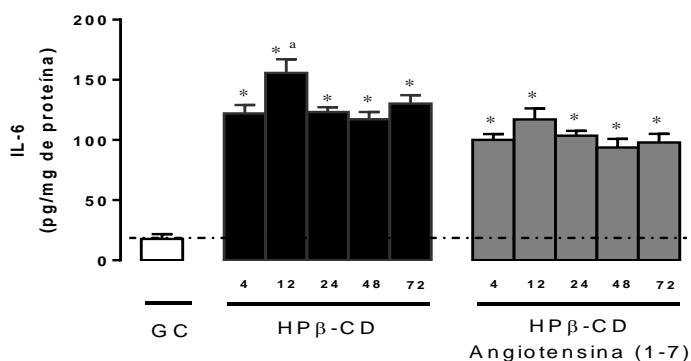


Figura 5. Níveis de IL-6 no músculo sóleo dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico. Asterisco (*) representa diferença significativa em relação ao GC ($p < 0,0001$). Letra (a) representa diferença significativa do grupo HPβ-CD em relação ao grupo HPβ-CD Angiotensina-(1-7) em mesmo tempo ($p < 0,0001$). One Way ANOVA, pós teste de Tukey.

Em relação aos níveis de IL-10, animais do grupo tratado com HPβ-CD, exibiram valores aumentados nos tempos de quatro (04) ($27,5 \pm 1,4$ pg/mg), 12 ($33,0 \pm 1,4$ pg/mg), 24 ($32,1 \pm 2,1$ pg/mg) e 48 ($22,0 \pm 2,4$ pg/mg) horas após o exercício físico em comparação com os animais do grupo controle. Da mesma forma, os animais do grupo tratado com HPβ-CD Ang-(1-7) apresentaram níveis elevados de IL-10 nos tempos de quatro (04) ($45,7 \pm 2,6$ pg/mg), 12 ($35,9 \pm 2,1$ pg/mg), 24 ($36,5 \pm 1,9$ pg/mg), e 48 ($22,8 \pm 2,4$ pg/mg) horas em comparação com o Grupo Controle (figura 6).

Comparado ao grupo tratado com HPβ-CD Ang-(1-7), animais do grupo tratado com HPβ-CD apresentaram níveis menores de IL-10 quatro (04) horas após o exercício físico. Ainda nestes grupos observamos que os níveis de IL-10 foram semelhantes nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico.

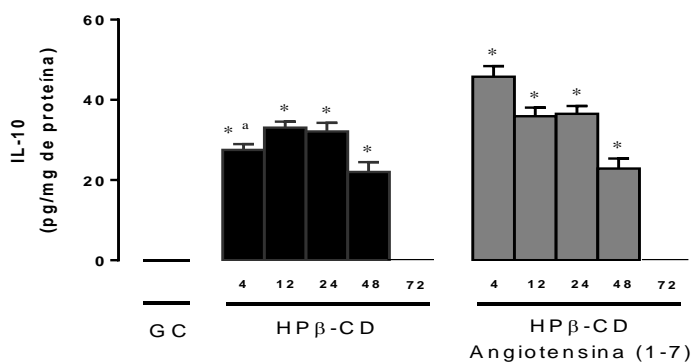


Figura 6. Níveis de IL-10 no músculo sóleo dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico. Asterisco (*) representa diferença significativa em relação ao GC ($p < 0,001$). Letra (a) representa diferença significativa do grupo HPβ-CD em relação ao grupo HPβ-CD Angiotensina-(1-7) em mesmo tempo ($p < 0,001$). One Way ANOVA, pós teste de Tukey.

4.4 Avaliações histológicas do músculo estriado esquelético sóleo

Em cortes histológicos de tecido muscular estriado esquelético sóleo, corados com HE, foram realizadas avaliações quantitativas para determinar o número de células inflamatórias (figuras 7 e 8). Para detecção de deposição de colágeno tecidual, foram realizadas análises em cortes histológicos corados com *Picrosirius red* em luz polarizada (figuras 9 e 10).

Comparado ao grupo controle (mediana = 45,6 células inflamatórias), os animais tratado com HPβ-CD mostraram aumento no número de células inflamatórias nos tempos de quatro (04) (mediana = 125,1 células inflamatórias) e 24 (mediana = 117,4 células inflamatórias) horas após o exercício físico. Por outro lado, o número de células inflamatórias dos animais tratado com HPβ-CD Ang-(1-7), apresentaram valores semelhantes aos dos animais do Grupo Controle.

Não foram observadas diferenças significativas no número de células inflamatórias dos animais do grupo tratado com HPβ-CD Ang-(1-7) e do grupo tratado com HPβ-CD em todos os tempos observados.

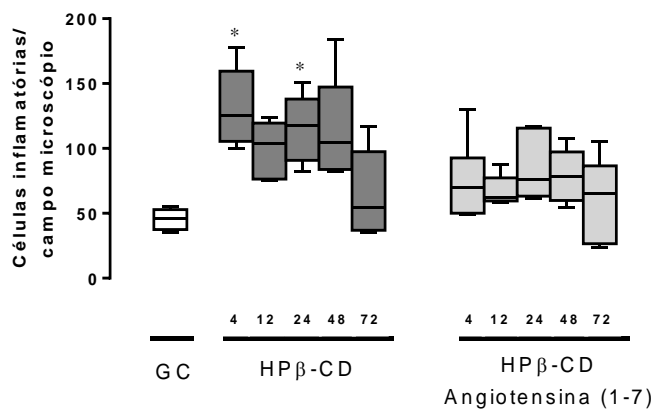


Figura 7. Número de células inflamatórias presentes no músculo sóleo dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico. Asterisco (*) representa diferença significativa em relação ao GC ($p < 0,001$). One Way ANOVA, pos teste de Dunn's.

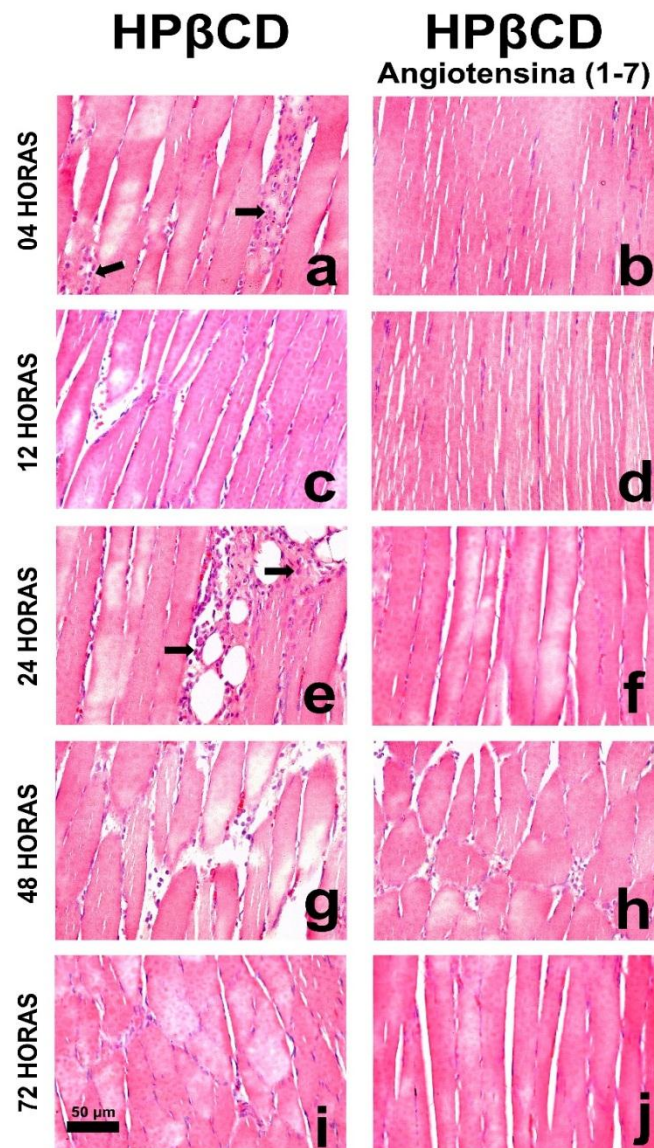


Figura 8. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de músculo estriado esquelético sóleo de animais tratados com o veículo HP β -CD (a, c, e, g e i) e com formulação de HP β -CD Angiotensina-(1-7) (b, d, f, h e j) corados pela Hematoxilina e Eosina. Notar aspecto histológico compatível com a normalidade em animais tratados com HP β -CD Angiotensina-(1-7) e aumento de infiltrado inflamatório (seta) em animais HP β -CD nos tempos de quatro (fotomicrografia a) e 24 horas (fotomicrografia e). Barra corresponde a 50 micrometros de largura.

Em relação á área de fibrose, avaliada pela detecção de colágeno com auxílio de luz polarizada, observamos que o grupo tratado com HP β -CD apresentou valores superiores nos tempos de 12 (mediana = 1.316 μm^2), 24 (mediana = 1.702 μm^2) e 48 (mediana = 1.356 μm^2) após o exercício físico quando comparados ao Grupo Controle (mediana = 250.7 μm^2). Por outro lado, os animais do grupo tratado com HP β -CD Ang-(1-7) apresentaram valores semelhantes aos do grupo controle em todos os tempos observados.

Animais do grupo tratado com HP β -CD Ang-(1-7) não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos tempos observados quando comparados aos animais do grupo tratado somente com HP β -CD.

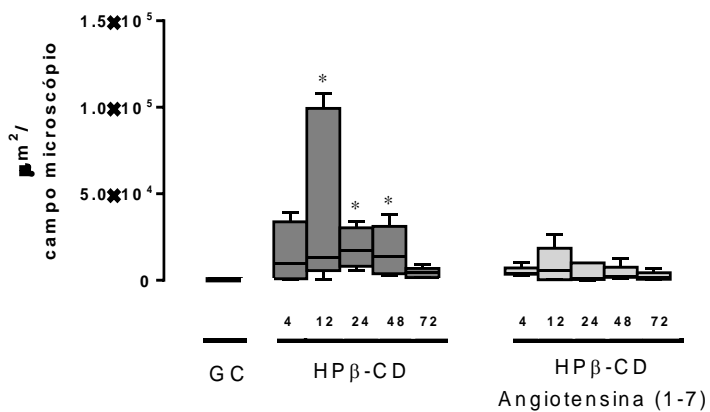


Figura 9. Área correspondente a deposição de colágeno no músculo sóleo dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HP β -CD e HP β -CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico. Asterisco (*) representa diferença significativa em relação ao GC ($p < 0,001$). One Way ANOVA, posteste de Dunn's.

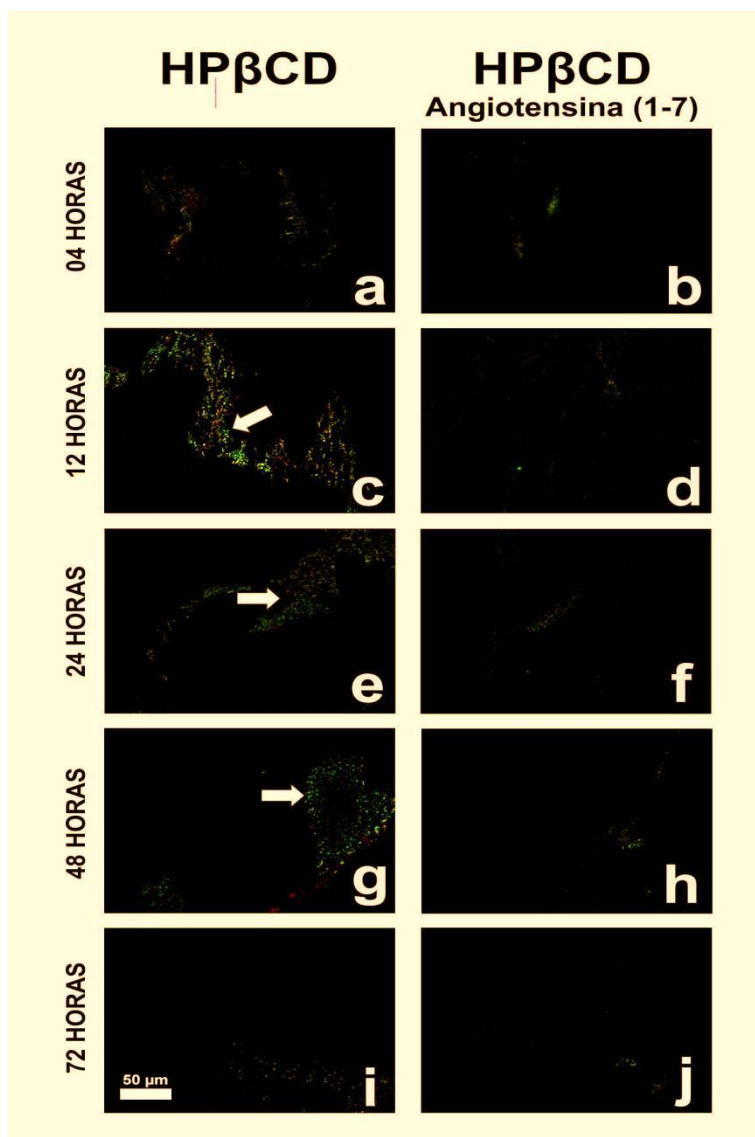


Figura 10. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de músculo estriado esquelético sóleo de animais tratados com o veículo HPβ-CD (a, c, e, g e i) e com formulação de HPβ-CD Angiotensina-(1-7) (b, d, f, h e j) corados pela técnica de Picrosirius observados à luz polarizada. Notar aspecto histológico compatível com a normalidade em animais tratados com HPβ-CD Angiotensina-(1-7) e aumento colágeno infiltrativo (seta) em animais HPβ-CD nos tempos 12 horas (fotomicrografia c), 24 horas (fotomicrografia e) e 72 horas (fotomicrografia g). Barra corresponde a 50 micrometros de largura.

4.5 Avaliação dos níveis teciduais de citocinas no músculo estriado esquelético gastrocnêmio

Durante a eutanásia dos animais, foram obtidos fragmentos do músculo estriado esquelético gastrocnêmio para avaliação dos níveis de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) teciduais no Grupo Controle e nos grupos tratados nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício. Os resultados estão apresentados nas figuras 11, 12 e 13.

Comparado aos animais do Grupo Controle, animais tratados com HP β -CD apresentaram níveis elevados de TNF- α nos tempos de quatro (04) ($54,5 \pm 2,6$ pg/mg), 12 ($58,8 \pm 3,4$ pg/mg), 24 ($23,3 \pm 7,4$ pg/mg) e 48 ($22,0 \pm 7,1$ pg/mg) horas. Ainda neste grupo observamos que os valores de TNF- α se equipararam ao Grupo Controle 72 horas após o exercício. Por outro lado, os animais do grupo tratado com HP β -CD Ang-(1-7) apresentaram níveis elevados de TNF- α somente nos tempos de quatro (04) ($45,0 \pm 2,6$ pg/mg) e 12 ($36,7 \pm 2,1$ pg/mg) horas em comparação com o Grupo Controle. Observamos que os níveis de TNF- α foram semelhantes 72 horas após o exercício físico (Figura 11).

Comparado ao grupo tratado com HP β -CD Ang-(1-7), animais do grupo tratado com HP β -CD apresentaram níveis maiores de TNF- α 12 horas após o exercício físico. Ainda nestes grupos observamos que os níveis de TNF- α foram semelhantes nos demais tempos observados após o exercício físico.

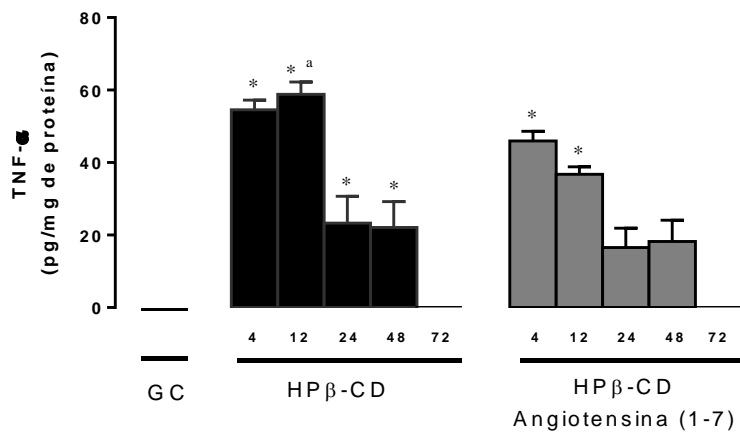


Figura 11. Níveis de TNF- α no músculo gastrocnêmio dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HP β -CD e HP β -CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico. Asterisco (*) representa diferença significativa do grupo HP β -CD em relação ao grupo HP β -CD Angiotensina-(1-7) em mesmo tempo ($p < 0,0001$). One Way ANOVA, pós teste de Tukey.

Em relação aos níveis de IL-6, os animais do grupo tratado com HP β -CD exibiram valores aumentados quando comparado ao Grupo Controle nos tempos de 24 ($111,9 \pm 6,3$ pg/mg), 48 ($110,6 \pm 5,0$ pg/mg) e 72 ($111,0 \pm 3,6$ pg/mg). O mesmo comportamento foi observado nos animais do grupo tratado com HP β -CD Ang-(1-7), o grupo apresentou níveis elevados de IL-6 nos tempos de 24 ($105,7 \pm 5,8$ pg/mg), 48 ($94,6 \pm 3,9$ pg/mg) e 72 ($92,9 \pm 3,9$ pg/mg) horas em comparação com o Grupo Controle (Figura 12).

Observamos que os níveis de IL-6 foram semelhantes em todos os tempos observados no grupo tratado com HP β -CD e no grupo tratado com HP β -CD Ang-(1-7).

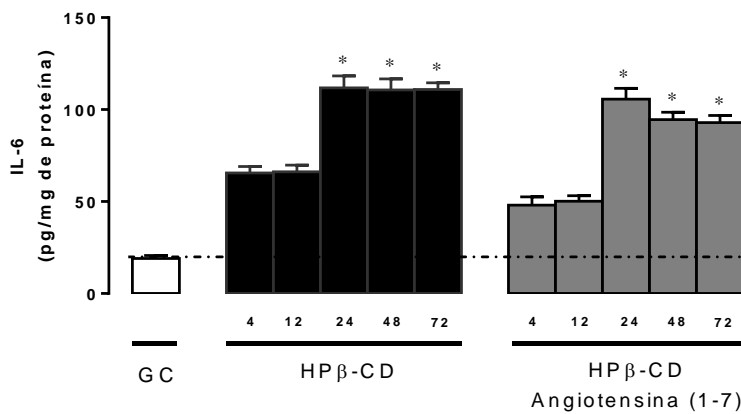


Figura 12. Níveis de IL-6 no músculo gastrocnêmio dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico. Asterisco (*) representa diferença significativa em relação ao GC ($p < 0,0001$). One Way ANOVA, pós teste de Tukey.

Em relação aos níveis de IL-10, os animais do grupo tratado com HPβ-CD mostraram níveis aumentados nos tempos de quatro (04) ($30,5 \pm 0,6$ pg/mg), 12 ($33,3 \pm 1,7$ pg/mg), 24 ($20,1 \pm 2,3$ pg/mg) e 48 ($10,5 \pm 3,5$ pg/mg) horas em comparação com o Grupo Controle. O grupo tratado com HPβ-CD Ang-(1-7), mostrou o mesmo comportamento, com níveis aumentados de IL-10 também nos tempos de quatro (04) ($36,0 \pm 1,7$ pg/mg), 12 ($36,6 \pm 1,6$ pg/mg), 24 ($56,2 \pm 3,2$ pg/mg) e 48 ($15,8 \pm 5,1$ pg/mg) horas em comparação com o Grupo Controle (Figura 13).

Em comparação ao grupo tratado com HPβ-CD Ang-(1-7), os animais tratados com HPβ-CD exibiram níveis menores de IL-10, 24 horas após o exercício físico.

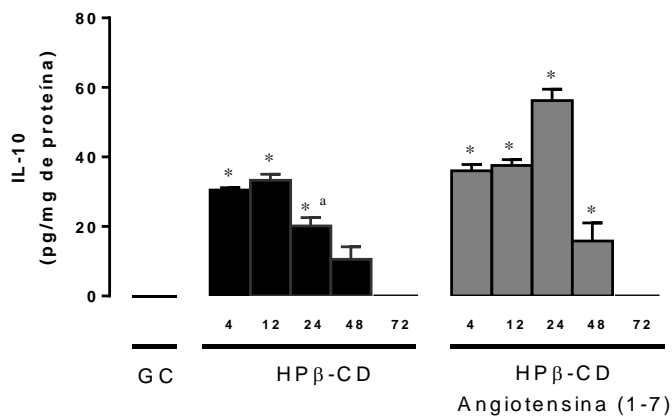


Figura 13. Níveis de IL-10 no músculo gastrocnêmio dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico. Asterisco (*) representa diferença significativa em relação ao GC ($p < 0,001$). Letra (a) representa diferença significativa do grupo HPβ-CD em relação ao grupo HPβ-CD Angiotensina-(1-7) em mesmo tempo ($p < 0,001$). One Way ANOVA, pós teste de Tukey.

4.6 Avaliações histológicas do músculo estriado esquelético gastrocnêmio

Em cortes histológicos de tecido muscular estriado esquelético gastrocnêmio, corados com HE, foram realizadas avaliações quantitativas para determinar o número de células inflamatórias (figuras 14 e 15). Para detecção de deposição de colágeno tecidual, foram realizadas análises em cortes histológicos corados com *Picrosirius red* em luz polarizada (figuras 16 e 17).

Comparado ao grupo controle (mediana = 35,4 células inflamatórias), os animais tratado com HPβ-CD mostraram aumento no número de células inflamatórias quatro (04) (mediana = 69,9 células inflamatórias) horas após o exercício físico. Por outro lado, o número de células inflamatórias dos animais tratado com HPβ-CD Ang-(1-7), apresentaram valores semelhantes aos dos animais do Grupo Controle.

Não foram observadas diferenças significativas no número de células inflamatórias dos animais do grupo tratado com HPβ-CD Ang-(1-7) e do grupo tratado com HPβ-CD em todos os tempos observados.

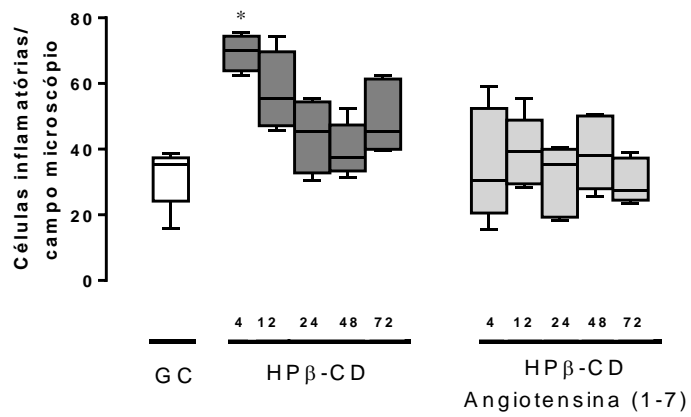


Figura 14. Número de células inflamatórias presentes no músculo gastrocnêmio dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico. Asterisco (*) representa diferença significativa em relação ao GC ($p < 0,001$). One Way ANOVA, pos teste de Dunn's.

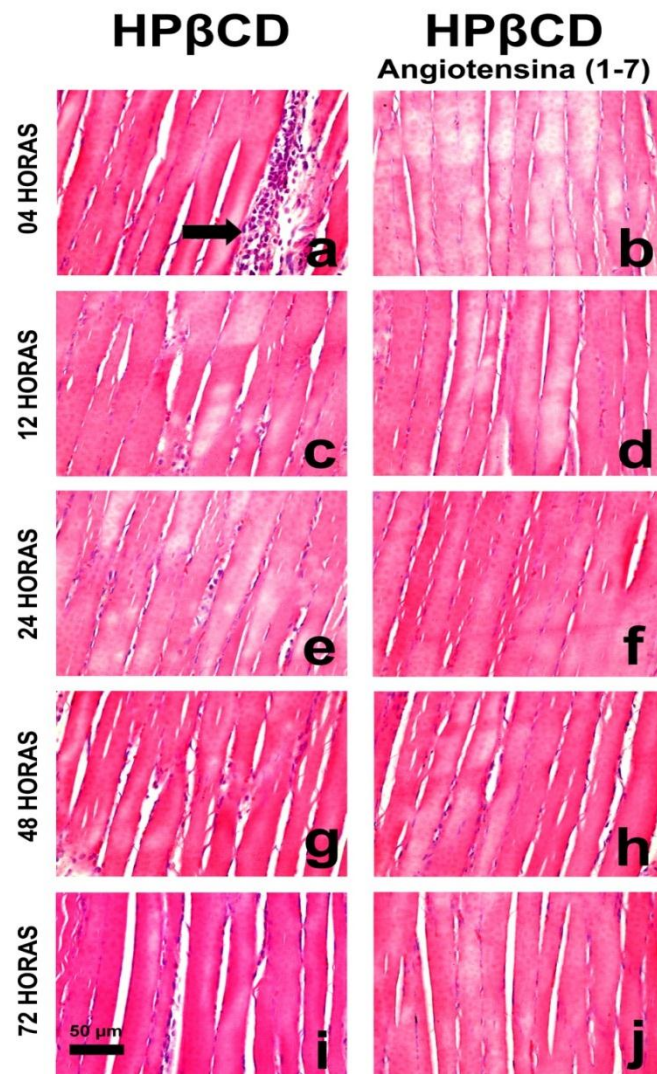


Figura 15. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de músculo estriado esquelético gastrocnêmio de animais tratados com o veículo HPβ-CD (a, c, e, g e i) e com formulação de HPβ-CD Angiotensina-(1-7) (b, d, f, h e j) corados pela Hematoxilina e Eosina. Notar aspecto histológico compatível com a normalidade em animais tratados com HPβ-CD Angiotensina-(1-7) e aumento de infiltrado inflamatório (seta) em animais HPβ-CD no tempo de quatro (fotomicrografia a) horas. Barra corresponde a 50 micrometros de largura.

Em relação á indução de fibrose no músculo gastrocnêmio, avaliada pela detecção de colágeno com auxílio de luz polarizada, observamos que o grupo tratado com HPβ-CD apresentou valores superiores nos tempos de quatro (04) (mediana = 1.599 μm²), 12 (mediana = 712 μm²), e 72 (mediana = 583 μm²) horas após o exercício físico quando comparados ao Grupo Controle (mediana = 191.4 μm²). Por outro lado, os animais do grupo tratado com HPβ-CD Ang-(1-7) apresentaram valores semelhantes aos do grupo controle em todos os tempos observados.

Animais do grupo tratado com HPβ-CD Ang-(1-7) não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos tempos observados quando comparados aos animais do grupo tratado somente com HPβ-CD.

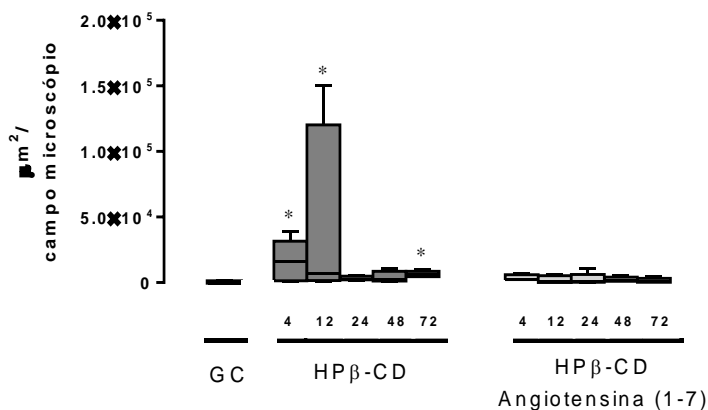


Figura 16. Área correspondente à deposição de colágeno no músculo gastrocnêmio dos animais do Grupo Controle (GC) e tratados com as formulações HPβ-CD e HPβ-CD Angiotensina-(1-7), nos tempos de quatro (04), 12, 24, 48 e 72 horas após o exercício físico. Asterisco (*) representa diferença significativa em relação ao GC (p<0,006). One Way ANOVA, post-teste de Dunn's.

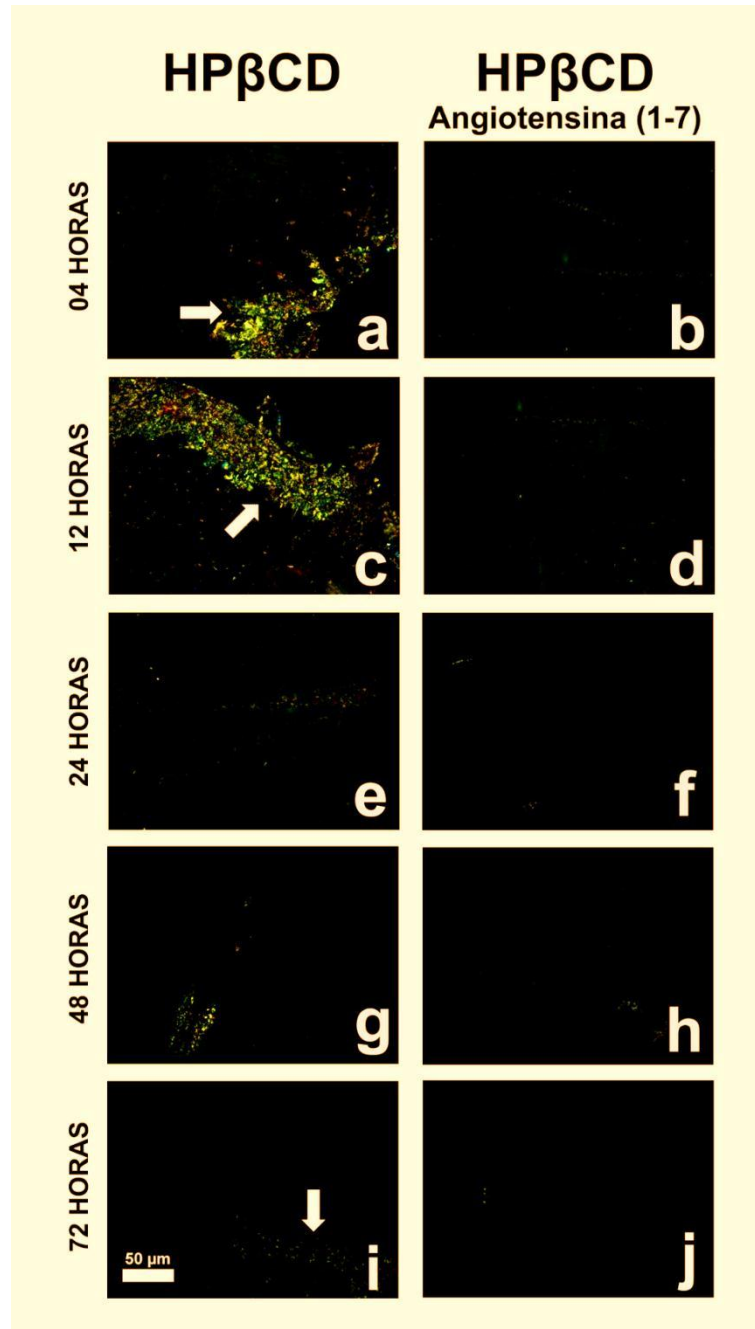


Figura 17. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de músculo estriado esquelético gastrocnêmio de animais tratados com o veículo HPβ-CD (a, c, e, g e i) e com formulação de HPβ-CD Angiotensina-(1-7) (b, d, f, h e j) corados pela técnica de Picrosirius observados à luz polarizada. Notar aspecto histológico compatível com a normalidade em animais tratados com HPβ-CD Angiotensina-(1-7) e aumento colágeno infiltrativo (seta) em animais HPβ-CD nos tempos 12 horas (fotomicrografia c), 24 horas (fotomicrografia e) e 48 horas (fotomicrografia g). Barra corresponde a 50 micrometros de largura.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento preventivo com a formulação oral de Ang-(1-7) diminuiu significativamente fatores que se associam à disfunções musculares, posteriores à lesões musculares induzidas pelo exercício físico. Neste estudo os níveis plasmáticos de CK e a concentração tecidual de citocinas pró-inflamatórias foram menores em ratos tratados com a formulação oral de HP β -CD Ang-(1-7) que em ratos tratados somente com a HP β -CD e animais do Grupo Controle, tanto nos músculos sóleo quanto no músculo gastrocnêmio. Além disso, observamos que a inflamação tecidual e a quantidade de tecido conjuntivo fibroso induzidas por exercício de contração excêntrica foram menores no grupo tratado com HP β -CD Ang-(1-7), comparado aos demais grupos.

Para indução de lesões no músculo estriado esquelético sóleo e gastrocnêmio, utilizamos um protocolo agudo de contração excêntrica, realizado em uma esteira rolante, inclinada negativamente. Os exercícios de contração excêntrica realizados de forma intensa e não regular podem causar danos às fibras musculares, rompimentos do sarcolema e extravasamento de proteínas para a corrente sanguínea (LAZARIM *et al.*, 2009). É consistentemente relatado na literatura que elevações dos níveis de CK no plasma indicam ruptura da membrana plasmática das fibras musculares e são rotineiramente utilizadas como medida indireta de danos musculares (CLARKSON; HUBAL, 2002; CLARKSON; NOSAKA; BRAUN, 1992). No presente estudo, avaliamos os níveis de CK no soro dos animais submetidos ao uma sessão de exercício predominantemente excêntrico e também animais do Grupo Controle. Os resultados obtidos mostraram que o protocolo para indução de lesões foi eficiente, uma vez que os níveis de CK foram maiores nestes animais quando comparado com o Grupo Controle. Outros estudos na Literatura corroboram como nossos resultados, e apontam o potencial lesivo de exercícios de contração excêntrica, tais como Liao *et al.*, (2010) e Kyparos *et al.*, (2011) que

demonstram aumento dos níveis séricos de CK em exercícios de downhill em modelos murinos.

Além disso, um importante achado deste estudo foi menor elevação dos níveis séricos de CK nos animais do grupo tratado com a formulação HP β -CD Ang-(1-7) comparado com os animais do grupo tratado com HP β -CD. Esse resultado sugere um possível efeito protetor da Ang-(1-7) na estrutura da membrana plasmática dos miócitos estriados esqueléticos durante o exercício físico intenso.

Nos últimos anos o SRA tem sido foco de estudo e associado como um fator importante no desenvolvimento de doenças relacionadas à musculatura esquelética. Vários estudos vêm utilizando inibidores de ECA e bloqueadores de receptor tipo 1 da Ang II (ARBs) como estratégia no tratamento de doenças musculares (CABELLO-VERRUGIO *et al.*, 2012). No presente estudo, mostramos pela primeira vez, o efeito do tratamento oral com HP β -CD Ang-(1-7) nas lesões musculares induzidas pelo exercício físico do tipo excêntrico. Verificamos que o tratamento com Ang-(1-7) atenuou as lesões musculares no grupo tratado, além de diminuir o ambiente inflamatório e fibrótico observado durante 72 horas após uma única sessão de exercício físico intenso.

Alguns estudos têm demonstram que o SRA desenvolve papel importante na patogênese de doenças inflamatórias e fibróticas. A Ang-(1-7) atua no bloqueio de algumas funções e vias de sinalização celulares relacionadas à mudanças teciduais, ativados pela Ang II tais como, diminuição no recrutamento de células inflamatórias, liberação de citocinas e deposição de proteínas da matriz extracelular. (IWATA *et al.*, 2005; MCCOLLUM *et al.*, 2012). Neste estudo, mostramos aumento dos níveis de citocinas nos músculos sóleo e gastrocnêmio em resposta ao exercício físico intenso de predominância excêntrica. Observamos que os animais tratados com Ang-(1-7) tiveram elevação reduzida nos níveis teciduais de TNF- α e IL-6 comparados à animais tratados apenas com o veículo HP β -CD. Nossos resultados demonstraram também aumento na concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 no grupo tratado com Ang-(1-7) em comparação aos demais grupos. Estes resultados estão

de acordo com estudos prévios que demonstram ação da Ang-(1-7) na alteração de ambientes inflamatórios teciduais.

Shenoy *et al.*, (2010), demonstraram menores níveis de TNF- α , IL - 1 β e IL-6, além de maiores níveis de IL-10, em ratos com doença pulmonar e que receberam transferência de gene de Ang-(1-7) e ACE 2. Estudo realizado por Sukumaran *et al.*, (2011) também demonstraram o mesmo comportamento após tratamento com bloqueadores de receptor AT₁ da Ang II Telmisartan e Olmesartan. Em outro estudo, estes mesmos autores observaram ativação do eixo ACE2/Ang-(1-7)/Receptor Mas o que contribuiu com os efeitos anti-inflamatórios em um modelo murino com miocardite autoimune. Os autores também observaram reduções nos níveis de TNF- α , IL - 1 β e IL-6 (SUKUMARAN *et al.*, 2012).

Elevações constantes de citocinas pró-inflamatórias em resposta à traumas ou doenças podem ocasionar perdas de massa muscular (GOODMAN, 1991;1994). TNF- α é uma citocina chave do processo inflamatório, sendo essencial para promover um aumento na degradação de proteínas no tecido muscular (GOODMAN, 1991; LI *et al.*, 2005) através de estimulação de astrogin-1 e diminuição de síntese de proteínas pela inibição da via de sinalização da ERK -1/2 (WILLIAMSON *et al.*, 2005). Dados na Literatura demonstram que TNF- α estimula a produção de IL-6, e essa interleucina tem como a sua principal fonte a musculatura esquelética (CHEN; HSIEH, 2001). Alguns estudos demonstram que a liberação de IL-6 está relacionada com a intensidade e duração do exercício físico (STEENSBERG *et al.*, 2000). Apesar de estar controverso na literatura, os dados referente à IL-6 tem demonstrado que produção desta citocina é aumentada significativamente em miofibrilas e células mononucleadas localizadas no local da lesão após danos musculares (CHEN; HSIEH, 2001; FISCHER, 2006).

Em contraste a ação pró-inflamatória, níveis aumentados de IL-10 agem diminuindo o ambiente inflamado (FERREIRA *et al.*, 2009). No conjunto, os dados referentes a marcadores inflamatórios obtidos direto dos tecidos musculares sugerem que o tratamento oral com a Ang-(1-7) exerce um importante efeito anti-inflamatório local após uma sessão de exercício físico exaustivo.

Em animais tratados com a formulação oral HP β -CD Ang-(1-7), em que observamos menores elevações de TNF- α e IL-6 e maior concentração de IL-10 nos músculos estriados esqueléticos sóleo e gastrocnêmio, também foram observados menor infiltração de células inflamatórias teciduais. Por outro lado, quando animais foram tratados apenas com o veículo, observamos microambiente com aumento das citocinas pró-inflamatórias e níveis reduzidos de citocinas anti-inflamatórias. Desta forma, nestes animais encontramos o maior infiltrado inflamatório ao decorrer das 72 horas após uma sessão de exercício físico com predominância excêntrica. Estes resultados corroboram com o trabalho de Cunha *et al.*, (2013) demonstrando que o tratamento por via oral com agonista do receptor Mas da Ang-(1-7), o AVE 0991, reduziu o número de células inflamatórias no coração e rim de animais com hipertensão renovascular. Em adição, trabalho realizado por Acunã *et al.*, (2014), demonstrou através da coloração de HE, que infusão por mini bomba osmótica e tratamento oral com Ang-(1-7) normalizou a arquitetura muscular esquelética de animais com distrofia de *Duchenne*.

Após as etapas inflamatórias do reparo dos tecidos lesionados observamos as etapas reparativas. Em lesões musculares a liberação de fatores de crescimento por células participantes do processo inflamatório induz a proliferação de um tecido reparativo, composto principalmente por colágeno tipo III e vasos sanguíneos. Com o avançar do processo de remodelamento, o colágeno inicial é reabsorvido e um colágeno mais espesso (colágeno tipo I) é produzido e organizado (PRABHU *et al.*, 2014). Observa-se então a retração e maior resistência à área fibróticas (PRABHU *et al.*, 2014). A avaliação do colágeno tipo III vem sendo amplamente utilizada na Literatura como marcador em lesões de cicatrização que ainda não tiveram processo de remodelamento finalizado (CALVI *et al.*, 2012).

A menor deposição colagênica tecidual foi o resultado mais expressivo encontrado em nosso estudo. Nossos resultados demonstraram o efeito benéfico do tratamento com Ang-(1-7) sobre a deposição de tecido conjuntivo fibroso, avaliadas através de análises histológicas dos músculos sóleo e gastrocnêmio. Observamos que o tratamento com a formulação HP β -CD Ang-(1-7) diminuiu a deposição de colágeno tipo III, nos tecidos musculares dos animais do grupo tratado com a Ang-

(1-7) em ambos os músculos estudados. Estes achados estão de acordo com estudos que demonstram os efeitos tanto do tratamento com Ang-(1-7), quanto dos bloqueadores do receptor AT1 (losartan) na diminuição da fibrose no tecido muscular. Estudo de Cabello-Verrugio *et al.* (2012) demonstrou diminuição tanto do colágeno tipo III quanto do tipo I, além de outras proteínas da matriz extracelular após tratamento com losartan em camundongos C57BL/10. Riquelme *et al.*, (2014) demonstraram que infusão sistêmica e tratamento oral com Ang-(1-7) normalizou a arquitetura de tecidos musculares, diminuiu a fibrose local e melhorou a função em animais com distrofia de *Duchenne*. Sendo assim, nossos dados, bem como da Literatura sugerem uma importante função do SRA na manutenção da arquitetura e funcionalidade de tecidos musculares estriados esqueléticos.

Em nosso estudo, avaliamos dois tipos de músculos estriados esqueléticos com características distintas. A escolha dos músculos estriados esqueléticos sóleo e gastrocnêmio fundamentou-se no fato de que ambos apresentam diferentes distribuições de fibras contráteis e características metabólicas (FERNANDES; HASHIMOTO; OLIVEIRA, 2010). Genericamente, os músculos esqueléticos podem ser classificados em músculos de contração rápida, tal como o músculo estriado esquelético gastrocnêmio, com predominância de fibras tipo II, mais adaptados aos trabalhos de curta duração e altas velocidades. Por outro lado, os músculos de contração lenta, tal como o músculo estriado esquelético sóleo, com predominância de fibras tipo I, são adequados para realização de trabalhos mais prolongados e de sustentação (GUTH; SAMAHA; ALBERS, 1970). Em geral, os músculos de contração lenta são responsáveis pela manutenção da postura, e os músculos de contração rápida, pela execução de movimentos articulares. Alguns estudos reportaram que em exercícios de contração excêntrica como no *dowhill running*, o músculo esquelético sóleo é o mais recrutado e as lesões neste músculo são mais agressivas em comparação com outros tecidos musculares (ARMSTRONG; OGILVIE; SCHWANE, 1983; LYNCH; FARY; WILLIAMS, 1997; SMITH *et al.*, 1997).

Como já reportado, expressão dos componentes tanto do eixo da Ang II, quanto do eixo da Ang-(1-7) foram encontrados nos tecidos musculares esqueléticos (CABELLO-VERRUGIO *et al.*, 2015; RIQUELME *et al.*, 2014).

Além disso, trabalho de Fernandes *et al.*, (2010) demonstrou que existe diferença na expressão de ECA e ECA2 entre os músculos esqueléticos sóleo e gastrocnêmio. Por essa razão, sugerimos que há um controle local do SRA diferente entre os dois músculos esqueléticos e talvez por isso os diferentes resultados encontrados no presente estudo.

Os pontos positivos do presente estudo foram a realização da coleta de amostras em diferentes horas e dias após o exercício. Amostras regulares de tecidos fornecem evidências diretas a respeito do processo de reparo tecidual. Sendo assim, a variação nos pontos de tempo, torna a compreensão mais clara do curso de tempo dos processos inflamatórios e fibróticos em resposta aos danos musculares induzidos pelo exercício físico. A maioria dos estudos analisa apenas um ou dois pontos de tempo após o exercício (KYPAROS *et al.*, 2011; LIAO *et al.*, 2010; TOUCHBERRY *et al.*, 2012), o que impede qualquer avaliação detalhada nas diferentes fases do processo de reparo tecidual. No nosso estudo, avaliamos cinco pontos de tempo distintos após a indução das lesões. De modo geral, observamos em nossos resultados que os tempos de quatro (04) e 12 horas, foram os tempos cruciais no tratamento com a formulação HP β -CD Ang-(1-7). Os resultados nestes tempos, mostraram menores níveis séricos de CK, menores concentrações teciduais de citocinas inflamatórias, aumento na concentração de IL-10 comparado à animais tratados com HP β -CD.

6. CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo mostram que o tratamento preventivo com a formulação oral da Ang-(1-7), tem papel fundamental em diferentes fases do processo de reparo das lesões musculares induzidas pelo exercício físico nos músculos sóleo e gastrocnêmio, pois:

- Gerou menores danos musculares;
- Promoveu aumento reduzido de citocinas pró-inflamatórias;
- Promoveu aumento de citocinas anti-inflamatórias;
- Levou a menor infiltração de células inflamatórias;
- Promoveu menor deposição de tecido de granulação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUNA, M. J. et al. Restoration of muscle strength in dystrophic muscle by angiotensin-1-7 through inhibition of TGF-beta signalling. **Hum Mol Genet**, v. 23, n. 5, p. 1237-49, Mar 1 2014.

ARMSTRONG, R. B.; OGILVIE, R. W.; SCHWANE, J. A. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 54, n. 1, p. 80-93, Jan 1983.

BENTER, I. F. et al. Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol**, v. 269, n. 1 Pt 2, p. H313-9, Jul 1995.

BINGHAM, C. O., 3RD. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. **J Rheumatol Suppl**, v. 65, p. 3-9, Sep 2002.

BISCHOFF, R. A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. **Dev Biol**, v. 115, n. 1, p. 140-7, May 1986.

CABELLO-VERRUGIO, C. et al. Angiotensin II receptor type 1 blockade decreases CTGF/CCN2-mediated damage and fibrosis in normal and dystrophic skeletal muscles. **J Cell Mol Med**, v. 16, n. 4, p. 752-64, Apr 2012.

CABELLO-VERRUGIO, C. et al. Renin-angiotensin system: an old player with novel functions in skeletal muscle. **Med Res Rev**, v. 35, n. 3, p. 437-63, May 2015.

CALVI, E. N. C. et al. An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. **Acta Cirúrgica Brasileira** v. 27, n. 10, p. 681-686, 2012.

CARLSON, B. M.; FAULKNER, J. A. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. **Med Sci Sports Exerc**, v. 15, n. 3, p. 187-98, 1983.

CEAFALAN, L. C.; POPESCU, B. O.; HINESCU, M. E. Cellular players in skeletal muscle regeneration. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 957014, 2014.

CHEN, T. C.; HSIEH, S. S. Effects of a 7-day eccentric training period on muscle damage and inflammation. **Med Sci Sports Exerc**, v. 33, n. 10, p. 1732-8, Oct 2001.

CISTERNAS, F. et al. Angiotensin-(1-7) decreases skeletal muscle atrophy induced by angiotensin II through a Mas receptor-dependent mechanism. **Clin Sci (Lond)**, v. 128, n. 5, p. 307-19, Mar 2015.

CLARKSON, P. M.; EBBELING, C. Investigation of serum creatine kinase variability after muscle-damaging exercise. **Clin Sci (Lond)**, v. 75, n. 3, p. 257-61, Sep 1988.

CLARKSON, P. M.; HUBAL, M. J. Exercise-induced muscle damage in humans. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 81, n. 11 Suppl, p. S52-69, Nov 2002.

CLARKSON, P. M.; NOSAKA, K.; BRAUN, B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. **Med Sci Sports Exerc**, v. 24, n. 5, p. 512-20, May 1992.

CUNHA, T. M. B. et al. The nonpeptide ANG-(1-7) mimic AVE 0991 attenuates cardiac remodeling and

improves baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 92, n. 266-275, 2013.

ENGVALL, E. Quantitative enzyme immunoassay (ELISA) in microbiology. **Med Biol**, v. 55, n. 4, p. 193-200, Aug 1977.

FAULKNER, J. A.; BROOKS, S. V.; OPITECK, J. A. Injury to skeletal muscle fibers during contractions: conditions of occurrence and prevention. **Phys Ther**, v. 73, n. 12, p. 911-21, Dec 1993.

FERNANDES, T.; HASHIMOTO, N. Y.; OLIVEIRA, E. M. Characterization of angiotensin-converting enzymes 1 and 2 in the soleus and plantaris muscles of rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 9, p. 837-42, Sep 2010.

FERRARIO, C. M.; IYER, S. N. Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. **Regul Pept**, v. 78, n. 1-3, p. 13-8, Nov 30 1998.

FERREIRA, A. J. et al. Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 179, n. 11, p. 1048-54, Jun 1 2009.

FILHO, C. M. F. et al. Laceration in rat gastrocnemius. Following-up muscle repairing by ultrasound biomicroscopy (in vivo), contractility test (ex vivo) and histopathology. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 13-23, 2015.

FISCHER, C. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? **Exerc Immunol Rev**, v. 12, p. 6-33, 2006.

GARG, K.; CORONA, B. T.; WALTERS, T. J. Losartan administration reduces fibrosis but hinders functional recovery after volumetric muscle loss injury. **J Appl Physiol (1985)**, v. 117, n. 10, p. 1120-31, Nov 15 2014.

GATTERER, H. et al. The effect of pulsating electrostatic field application on the development of delayed onset of muscle soreness (DOMS) symptoms after eccentric exercise. **J Phys Ther Sci**, v. 27, n. 10, p. 3105-7, Oct 2015.

GEBHARD, F. et al. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? **Arch Surg**, v. 135, n. 3, p. 291-5, Mar 2000.

GOODMAN, M. N. Tumor necrosis factor induces skeletal muscle protein breakdown in rats. **Am J Physiol**, v. 260, n. 5 Pt 1, p. E727-30, May 1991.

_____. Interleukin-6 induces skeletal muscle protein breakdown in rats. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 205, n. 2, p. 182-5, Feb 1994.

GUTH, L.; SAMAHA, F. J.; ALBERS, R. W. The neural regulation of some phenotypic differences between the fiber types of mammalian skeletal muscle. **Exp Neurol**, v. 26, n. 1, p. 126-35, Jan 1970.

HAUSSWIRTH, C. et al. Effects of whole-body cryotherapy vs. far-infrared vs. passive modalities on recovery from exercise-induced muscle damage in highly-trained runners. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e27749, 2011.

IWATA, M. et al. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289, n. 6, p. H2356-63, Dec 2005.

JARVINEN, M. J.; LEHTO, M. U. The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. **Sports Med**, v. 15, n. 2, p. 78-89, Feb 1993.

JUNQUEIRA LC; BIGNOLAS G; RR, B. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

KIM, J.; LEE, J. The relationship of creatine kinase variability with body composition and muscle damage markers following eccentric muscle contractions. **J Exerc Nutrition Biochem**, v. 19, n. 2, p. 123-9, Jun 2015.

KYPAROS, A. et al. Effect of 5-day vitamin E supplementation on muscle injury after downhill running in rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 111, n. 10, p. 2557-69, Oct 2011.

LAZARIM, F. L. et al. The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship. **J Sci Med Sport**, v. 12, n. 1, p. 85-90, Jan 2009.

LI, Y. P. et al. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. **FASEB J**, v. 19, n. 3, p. 362-70, Mar 2005.

LIAO, P. et al. Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor-alpha. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 3, p. R599-607, Mar 2010.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117-26, Feb 2000.

LYNCH, G. S.; FARY, C. J.; WILLIAMS, D. A. Quantitative measurement of resting skeletal muscle [Ca²⁺]_i following acute and long-term downhill running exercise in mice. **Cell Calcium**, v. 22, n. 5, p. 373-83, Nov 1997.

MALM, C.; LENKEI, R.; SJÖDIN, B. Effects of eccentric exercise on the immune system in men. **J Appl Physiol** v. 86, p. 461-468, 1999.

MCCOLLUM, L. T.; GALLAGHER, P. E.; TALLANT, E. A. Angiotensin-(1-7) abrogates mitogen-stimulated proliferation of cardiac fibroblasts. **Peptides**, v. 34, n. 2, p. 380-8, Apr 2012.

MENESES, C. et al. The angiotensin-(1-7)/Mas axis reduces myonuclear apoptosis during recovery from angiotensin II-induced skeletal muscle atrophy in mice. **Pflugers Arch**, v. 467, n. 9, p. 1975-84, Sep 2015.

MORALES, M. G. et al. Expression of the Mas receptor is upregulated in skeletal muscle wasting. **Histochem Cell Biol**, v. 143, n. 2, p. 131-41, Feb 2015.

NEWHAM, D. J.; JONES, D. A.; CLARKSON, P. M. Repeated high-force eccentric exercise: effects on muscle pain and damage. **J Appl Physiol (1985)**, v. 63, n. 4, p. 1381-6, Oct 1987.

NOSAKA, K. et al. Attenuation of muscle damage by preconditioning with muscle hyperthermia 1-day prior to eccentric exercise. **Eur J Appl Physiol**, v. 99, n. 2, p. 183-92, Jan 2007.

PEAKE, J.; NOSAKA, K.; SUZUKI, K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. **Exerc Immunol Rev**, v. 11, p. 64-85, 2005.

PRABHU, V. et al. Objective assessment of endogenous collagen in vivo during tissue repair by laser induced fluorescence. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e98609, 2014.

PRASARTWUTH, O.; TAYLOR, J. L.; GANDEVIA, S. C. Maximal force, voluntary activation and muscle soreness after eccentric damage to human elbow flexor muscles. **J Physiol**, v. 567, n. Pt 1, p. 337-48, Aug 15 2005.

PUTHUCHEARY, Z. et al. The ACE gene and human performance: 12 years on. **Sports Med**, v. 41, n. 6, p. 433-48, Jun 1 2011.

QUN, Z.; XINKAI, Y.; JING, W. Effects of eccentric exercise on branched-chain amino acid profiles in rat serum and skeletal muscle. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** v. 98 p. 215–222, 2014.

RAEBURN, C. D. et al. Cytokines for surgeons. **Am J Surg**, v. 183, n. 3, p. 268-73, Mar 2002.

RIQUELME, C. et al. ACE2 is augmented in dystrophic skeletal muscle and plays a role in decreasing associated fibrosis. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93449, 2014.

SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. **Regul Pept**, v. 91, n. 1-3, p. 45-62, Jul 28 2000.

SHENOY, V. et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 182, n. 8, p. 1065-72, Oct 15 2010.

SMITH, H. K. et al. Skeletal muscle damage in the rat hindlimb following single or repeated daily bouts of downhill exercise. **Int J Sports Med**, v. 18, n. 2, p. 94-100, Feb 1997.

SOARES, E. R. et al. Cardiac and renal effects induced by different exercise workloads in renovascular hypertensive rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 6, p. 573-82, Jun 2011.

STEENBERG, A. et al. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. **J Physiol**, v. 529 Pt 1, p. 237-42, Nov 15 2000.

SUKUMARAN, V. et al. Telmisartan acts through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/mas receptor in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis. **Life Sci.**, v. 90, p. 289-300, 2012.

SUKUMARAN, V. et al. Cardioprotective effects of telmisartan against heart failure in rats induced by experimental autoimmune myocarditis through the modulation of angiotensin-converting enzyme-2/angiotensin 1-7/mas receptor axis. **Int J Biol Sci.**, v. 7, n. 8, p. 1077-1092, 2011.

TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M.; GALLAGHER, P. E. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289, n. 4, p. H1560-6, Oct 2005.

TANABE, Y. et al. Attenuation of indirect markers of eccentric exercise-induced muscle damage by curcumin. **Eur J Appl Physiol**, v. 115, n. 9, p. 1949-57, Sep 2015.

TIDBALL, J. G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. **Compr Physiol**, v. 1, n. 4, p. 2029-62, Oct 2011.

TOUCHBERRY, C. D. et al. Acute heat stress prior to downhill running may enhance skeletal muscle remodeling. **Cell Stress Chaperones**, v. 17, n. 6, p. 693-705, Nov 2012.

VITALE, R. F.; RIBEIRO FDE, A. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 73, n. 1, p. 117-21, Jan-Feb 2007.

VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D. E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. **J Clin Pathol**, v. 31, n. 6, p. 507-20, Jun 1978.

WILLIAMSON, D. L.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Acute treatment with TNF-alpha attenuates insulin-stimulated protein synthesis in cultures of C2C12 myotubes through a MEK1-sensitive mechanism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 289, n. 1, p. E95-104, Jul 2005.

YOSHIDA, T.; HUQ, T. S.; DELAFONTAINE, P. Angiotensin type 2 receptor signaling in satellite cells potentiates skeletal muscle regeneration. **J Biol Chem**, v. 289, n. 38, p. 26239-48, Sep 19 2014.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, n. 2, p. 27-37, Spring 2007.