

INIBIÇÃO DA NOX2 REGULA A EXPRESSÃO GÊNICA NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS SUBMETIDOS A UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO EXAUSTIVO AGUDO

Paulo Elesson Guimarães de Oliveira¹
Denner Silvino da Silva²
Maria Alice Felipe Oliveira³
Isabele da Silva Perereira⁴
Juliana Osório Alves⁵

INTRODUÇÃO

O exercício exaustivo agudo possui uma curta duração e uma alta intensidade, com efeitos benéficos no metabolismo, se realizado corretamente (THOMPSON, 2001). Sem as devidas adaptações e condicionamento, essa prática pode gerar efeitos de desgastes no tecido por conta da sobrecarga exigida ao praticante (LEES, 2005, POWERS, 1999). Uma única sessão de exercício exaustivo agudo, podem causar alterações no equilíbrio redox do organismo, como o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs). No entanto, tal aumento se faz necessário para permitir uma regulação positiva nas defesas e na adaptação antioxidante ao exercício (FISHER, 2009). A alteração no equilíbrio redox no corpo gera um quadro de Estresse Oxidativo, uma situação de excesso de EROs em desequilíbrio quanto a ação de antioxidantes (SIES, 1997).

O musculo esquelético é um potente gerador de EROs. O sóleo (SOL) é um músculo predominantemente fibra do Tipo I de contração lenta (FOWLES; GREEN OUYANG, 2004), e possui diferenças a respeito do metabolismo de EROs (LOUREIRO et al, 2016). Recentemente, alguns estudos apontam diferenças também em relação à defesa antioxidante,

² Graduando do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Ceará - UECE, paulo.elesson@gmail.com;

² Graduando do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Ceará - UECE, dennerbio.silvino@gmail.com;

³ Graduando do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Ceará - UECE, alicemafo2@gmail.com;

⁴ Mestrando do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará - UFC, bel06_silva@hotmail.com;

⁵ Professor orientador: Mestre, Centro Universitário Estácio do Ceará- Via Corpvs, juosorio@gmail.com

ao conteúdo mitocondrial e também no metabolismo de EROs (PICARD, 20012; ANDERSON, 2006).

Identifica-se que a NADPH oxidase possa ser uma das principais estruturas envolvidas no estresse oxidativo. Alguns inibidores farmacológicos da NADPH oxidase que bloqueiam diretamente a atividade desta enzima têm sido descritos (WILLIAMS, 2007; OLUKMAN, 2010; STEFANSKA, 2010; WINIARSKA, 2010). Dentre eles, a apocinina aparece com 692 registros de publicações no banco de dados PubMed até 15 de janeiro de 2009, dos quais 571 são específicos para a chave “apocynin NADPH oxidase inhibition”, demonstrando a forte correlação entre os termos.

O uso de inibidores específicos de oxidases, baseado nas unidades Nox, pode fornecer ferramentas para elucidar os papéis destas enzimas experimentalmente. Também pode ser útil no tratamento de algumas doenças, principalmente no que se refere à inibição enzimática seletiva com o intuito de reduzir o dano oxidativo decorrente da produção excessiva de EROs sem, entretanto, comprometer o mecanismo de sinalização celular dependente das referidas espécies.

METODOLOGIA

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE) sob o número 5236655/2016. Foram utilizados 40 ratos machos albinos da linhagem Wistar com 60 dias de vida e peso médio de 220 - 250g, obtidos do biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h), em ambiente com temperatura controlada entre 22 a 25°C, e com ração e água *ad libitum*. Grupo Controle (10); grupo Exercício (10); grupo Apocinina (10) e; grupo Apocinina-exercício (10).

Os animais dos grupos exercício e apocinina-exercício foram ambientados, por duas semanas, em uma esteira ergométrica para o uso em roedores (INBRAMED), no período noturno, condições próximas aos que os mesmos serão exercitados posteriormente. Os animais foram submetidos à caminhada na esteira motorizada por 5 a 10 minutos por dia a uma velocidade de 0,4 km/h, 5 dias por semana. Este período foi utilizado para a familiarização dos animais às condições ambientais do experimento e minimização do estresse gerado pelo exercício (KREGEL et al, 2006).

Após duas semanas de adaptação, os grupos EXC e EXC-APO foram submetidos à uma sessão de exercício extenuante que consiste em etapas de 3 minutos de corrida em carga constante, com incrementos de 0,2 km/h entre etapas subsequentes até a exaustão do animal. A exaustão dos animais foi determinada pela recusa do animal à corrida mesmo sob estimulação manual e pela perda da coordenação das patas anteriores e posteriores (KREGEL et al 2006).

Os animais do grupo APO e APO-EXC receberam 30 mg de Apocinina por kg de peso corporal, administrada 30 minutos antes do exercício exaustivo por via oral através de gavagem (*Apocynin* - Santa Cruz Biotechnology). Esta concentração de Apocinina foi escolhida em função de outros estudos que administraram essa mesma quantidade tanto em ratos (HAYASHI, et al, 2005; BRAUMER, et al, 2007; OELZE et al, 2011) quanto em camundongos (LI et al, 2011) durante curtos e longos períodos e observaram sua eficácia em inibir o complexo enzimático NADPH oxidase. Nos animais do grupo (EXC) foram administradas por gavagem o veículo (solução salina) em volume equivalente ao da apocinina, com a finalidade de evitar possibilidades de qualquer influência do estresse gerado pela administração da droga.

Os animais foram eutanasiados: 24 horas após o exercício. Foram anestesiados com Tiopental sódico (150mg/Kg) via intraperitoneale sacrificados por decapitação. Amostras do músculo sóleo foram dissecadas, pesadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Essas amostras foram então acondicionadas em freezer -80 °C.

O RNA total foi extraído por meio do reagente Trizol® de acordo com as especificações do fabricante. O RNA foi quantificado pela razão 260/280nm de comprimento de onda (~1.9) por meio do espectrofotômetro. A síntese de cDNA foi realizada através do kit ImProm-II Reverse Transcription System. A análise quantitativa da expressão gênica foi realizada através da técnica de PCR em tempo real utilizando o sistema Biorad CFX 96.

DESENVOLVIMENTO

A produção excessiva de EROs via NADPH oxidase apresentam implicações para uma grande diversidade de enfermidades ou situações que possam desencadear o processo de estresse oxidativo (FINNEMORE, 1908; KANEGAE, 2010; PETRÔNIO, 2013). As enzimas NADPH Oxidase formam um complexo enzimático associado à membrana plasmática, são encontradas em diferentes tipos de células de origem mesodérmica (BABIOR, 1999; BABIOR 2004). A ação catalítica na produção de O_2^- , pela redução de elétrons de oxigênio, conta com a atuação de diferentes isoformas que podem ser encontradas em variadas localizações na

célula. As variações mais comuns da NOX encontradas no músculo esquelético, são: Nox 1, Nox 2, Nox 4. A atividade de NOX geralmente requer a associação de uma subunidade catalítica (a NOX) com outras proteínas. A isoforma NOX2 depende de pelo menos cinco subunidades: p47phox, p67phox, p40phox, p22phox, e a subunidade catalítica NOX2. Com relação a localização, p47phox, p67phox e p40phox existem no citosol, enquanto que p22phox e NOX2 formam o citocromo b558, um dímero característico ligado à membrana (TOUYZ, 2011).

A 4'-hidroxi-3'-metoxi-acetofenona, conhecida como apocinina ou acetovanilona, é um composto orgânico natural que age inibindo o complexo NADPH oxidase. A apocinina impede a translocação da p47phox para Nox2 em leucócitos, monócitos e células endoteliais (STOLK, 1994; JOHNSON, 2002), mas não se sabe sobre sua eficiência no musculo esquelético.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na expressão do gene NOX2 do musculo sóleo de ratos, os valores de mRNA representam a média \pm erro padrão e expressos em unidades arbitrárias, as diferenças estatísticas significantes entre os grupos possuem $p < 0,05$. Os resultados indicaram um aumento significativo da expressão do gene NOX2 no grupo EXC quando comparado ao grupo CTL ($2,31 \pm 0,11$), e uma redução significativa da expressão do gene NOX2 no grupo APO ($0,98 \pm 0,10$), que reduziu mais ainda no grupo EXC-APO ($0,57 \pm 0,11$).

A NADPH oxidase parece participar das vias sinalizadoras para as adaptações induzidas pelo exercício exaustivo no músculo sóleo, oxidativo de contração lenta. O aumento da expressão gênica de NOX pode representar maior produção de EROs e conseqüentemente o aumento da atividade oxidativa. Em um estado agudo de exercício exaustivo, quando associado com a Apocinina, a baixa expressão gênica dessa isoforma representa uma alternativa no combate ao dano oxidativo.

No trabalho de Henríquez-Olguín e colaboradores (2016) foi observado que o grupo exercício obteve um aumento significativo da proteína Nox 2 e p47phox (isoforma bloqueada pela apocinina) em comparação ao controle e o grupo tratado com apocinina, indicando uma inibição total da ativação da Nox 2 durante um treinamento de endurance de longa duração, o que fortalece os resultados do presente estudo mostrando uma expressão significativa de NOX2 após 24h de exercício exaustivo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com isso nossos resultados sugerem que a apocinina teve efeito sobre a função, estrutura e estado redox do Musculo esquelético de ratos após uma sessão de exercício exaustivo, o que indica que a apocinina inibiu as adaptações induzidas pelo exercício exaustivo no músculo sóleo.

Palavras-chave: NADPH, APOCININA, EXERCÍCIO

REFERÊNCIAS

1. ANDERSON EJ, NEUFER PD. Type II skeletal myofibres possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation. **Am J Physiol Cell Physiol** 290, C844–851, 2006.
2. BABIOR, Bernard M. NADPH oxidase. **Current opinion in immunology**, v. 16, n. 1, p. 42-47, 2004.
3. BABIOR, Bernard M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, 1999.
4. BÄUMER, Anselm T. et al. A apocinina inibidora da NAD (P) H oxidase melhora o balanço endotelial de NO / superóxido e reduz efetivamente a pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos: comparação com o bloqueio do canal de cálcio. **Hipertensão clínica e experimental**, v. 29, n. 5, p. 287-299, 2007.
5. FINNEMORE, H. CXLVI. - The constituents of Canadian hemp. Part I. Apocynin. **Journal of the Chemical Society**, Transactions 1908, 93, 1513.
6. FISHER-WELLMAN, Kelsey; BLOOMER, Richard J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. **Dynamic medicine**, v. 8, n. 1, p. 1, 2009.
7. FOWLES JR, GREEN HJ, OUYANG J. Na⁺-K⁺-ATPase in rat skeletal muscle: content, isoform, and activity characteristics. **J Appl Physiol**, 2004.
8. HAYASHI T, JULIET P.A, KANO-HAYAS H. TNUNEKAWKT. DINGQUNFANG. NADPH oxidase inhibitor, apocynin, restores the impaired endothelial- dependent and independent responses and scavenges superoxide anion in rats with type 2 diabetes complicated by NO dysfunction. **Diabetes Obes Metab.**2005
9. HENRÍQUEZ-OLGUÍNA, C.; BAGHERSAD R.L; ARAB-CESCHIAA, R.; RAUNA,S.H.; BHATIAA, Z.A.L.; KNUDSENA,J.R ;HOLMDAHL,R. ; JENSEN,T.E. Adaptations to high-intensity interval training in skeletal muscle require NADPH oxidase 2. **Redox Biology**. 24. 2019.
10. JOHNSON, David K. et al. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium**, v. 9, n. 3, p. 191-203, 2002.
11. KANEGAE, M. P. P.; CONDINO-NETO, A.; PEDROZA, L. A.; ALBERTO.; DE ALMEIDA, A. C.; REHDER, J.; DA FONSECA, L. M.; XIMENES, V. F. Diapocynin versus apocynin as pretranscriptional inhibitors of NADPH oxidase and cytokine

- production by peripheral blood mononuclear cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 2010, 393, 551.
12. LEES, S.; BOOTH, F. Physical inactivity is a disease. **World review of nutrition and dietetics**, v. 95, n. R, p. 73, 2005.
 13. LI, Yu-Long; ZHENG, Hong. Angiotensin II-NADPH oxidase-derived superoxide mediates diabetes-attenuated cell excitability of aortic baroreceptor neurons. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 301, n. 6, p. C1368-C1377, 2011.
 14. LOUREIRO, A.C.C.; REGO-MONTEIRO, I.C.; LOUZADA, R.A.; ORTENZI, V.H.; AGUIAR, A.P.; ABREU, E.S.; CAVALCANTE-DE-ALBUQUERQUE, J.P.A.; HECHT, F.; OLIVEIRA, A.C.; CECCATTO, V.M.; FORTUNATO, R.S.; CARVALHO, D.P. Differential Expression of NADPH Oxidases Depends on Skeletal Muscle Fiber Type in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016.
 15. OELZE, Matthias et al. NADPH oxidase accounts for enhanced superoxide production and impaired endothelium-dependent smooth muscle relaxation in BK β 1-/- mice. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 8, p. 1753-1759, 2006.
 16. OLUKMAN, M. et al. Apocynin restores endothelial dysfunction in streptozotocin diabetic rats through regulation of nitric oxide synthase and NADPH oxidase expressions. *J. diabetes its complicat.*, New York, v. 24, pt.6, p. 415-423, 2010.
 17. PETRÔNIO, M. S.; ZERAIK, M. L.; DA FONSECA, L. M.; XIMENES, V. F. Apocynin: Chemical and Biophysical Properties of a NADPH Oxidase Inhibitor. *Molecules* 2013, 18, 2821.
 18. PICARD M, HEPPLER R , BURELLE Y. Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. **Am J Physiol Cell Physiol**. 302: C629–C641, 2012.
 19. POWERS, Scott K.; JI, Li Li; LEEUWENBURGH, Christiaan. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 31, n. 7, p. 987-997, 1999.
 20. SIES, Helmut. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology: Translation and Integration**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.
 21. STEFANSKA, J. et al. Apocynin decreases hydrogen peroxide and nitrate concentrations in exhaled breath in healthy subjects. *Pulm. pharmacol. ther.*, London, v. 23, n.1, p. 48-54, 2010.

22. STOLK, T. J. HILTERMANN, J. H. DIJKMAN, AND A. J. VERHOEVEN, “Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol,” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 11, no. 1, pp. 95–102, 1994.
23. THOMPSON, PAUL D. et al. The acute versus the chronic response to exercise. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 33, n. 6 Suppl, p. S438-45; discussion S452-3, 2001.
24. TOUYZ, Rhian M. et al. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. **Molecular interventions**, v. 11, n. 1, p. 27, 2011.
25. WILLIAMS, H. C.; GRIENGLING, K. K. NADPH Oxidase Inhibitors: New Antihypertensive Agents? *J. cardiovasc. pharmacol.*, New York, v. 50, n. 1, p. 9-16, 2007.
26. WINIARSKA, K. et al. Inhibition of renal gluconeogenesis contributes to hypoglycaemic action of NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Chem. biol. interact.*, Amsterdam, v. 189, p. 119-126, 2010.