

EFEITO DA INIBIÇÃO POR APOCININA SOBRE O DANO OXIDATIVO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS APÓS EXERCÍCIO EXTENUANTE AGUDO

Maria Alice Felipe Oliveira ¹
Paulo Elesson Guimarães de Oliveira ²
Isabele da Silva Pereira ³
Denner Silvino da Silva ⁴
Juliana Osório Alves ⁵

INTRODUÇÃO

Acreditava-se inicialmente que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) estava associada apenas aos danos oxidativos e efeitos deletérios às células. Atualmente, evidências sugerem que as EROs desempenham papel benéfico e estão associadas às adaptações estruturais e funcionais das células, por meio de regulação de vias de sinalizações celulares (STROBEL *et al.*, 2011). Nas células musculares, sabe-se que sua função é dependente do estado redox das mesmas. De fato, a produção exacerbada destas EROs é um fator limitante da contração muscular, no entanto, um ambiente celular reduzido também afeta negativamente a função muscular (POWERS *et al.*, 2011).

A NADPH oxidase é um importante complexo enzimático produtor de ERO no músculo esquelético (ME) e considerada como principal fonte de ERO no citosol durante a contração. Além disso, as proteínas envolvidas na contração muscular são sensíveis e reguladas dependente do estado redox celular, e, a NADPH oxidase está localizada, aparentemente de forma estratégica, próxima a estas proteínas (HENRIQUEZ *et al.*, 2019).

Pouco se sabe ainda a respeito da regulação desse sistema no músculo durante o exercício, entretanto recentemente Sakellariou et al, 2013 examinaram a contribuição das fontes mitocondriais e não mitocondriais para o aumento agudo do superóxido durante as contrações musculares e concluíram que os efeitos da NADPH oxidase predominaram sobre mitocôndrias durante os curtos períodos de contração em 10 e 15 minutos que foram estudadas. Assim, os

¹ Graduanda do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual, - CE, alicemafo2@gmail.com;

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

³ Mestranda em Biotecnologia da Universidade Federal, - CE, bel06_silva@hotmail.com;

⁴ Graduando do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual - CE, denner.silvino@aluno.uece.br;

⁵ Professor orientador: Mestre em ciências fisiológicas, Centro Universitário Estácio do Ceará - CE, juosorio@gmail.com.

dados encontrados indicaram que a NADPH-oxidase (possivelmente a isoforma NOX 2) e não a mitocôndria, seja a principal fonte de geração de superóxido durante a atividade contrátil de curto prazo, porém esse mecanismo ainda não está totalmente esclarecido.

O uso de inibidores específicos de oxidases, baseado nas NADPH oxidases pode fornecer ferramentas para elucidar os papéis destas enzimas experimentalmente. Desta forma inibidores da NADPH oxidase como a apocinina vem sendo alvo de pesquisa quando se trata de experimentação in vivo que envolve inativação desse complexo enzimático (PERÉZ *et al.*, 2010).

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

Este trabalho foi aprovado pelo CEUA/UECE, nº 5236655/2016. Foram utilizados 32 ratos machos Wistar com 60 dias de vida e peso entre 200-230g, obtidos do Biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará. Os animais foram divididos em controle repouso (CR), controle exercício (CE), apocinina repouso (AR) e apocinina exercício (AE). A droga foi administrada para os animais do grupo AR e AE via oral com 4 mL de apocinina, enquanto que no grupo controle houve uma administração de 4 mL de veículo (salina), ambos durante 3 dias. A eutanásia foi realizada com Tiopental sódico (150mg/Kg) com 24 horas após o terceiro dia de administração da droga.

Após eutanásia dos animais, o sóleo foi dissecado, pesado e posteriormente condicionado em nitrogênio líquido a -190 °C para então ser guardado em freezer -80 °C. O tecido muscular foi homogeneizado em 1 mL de tampão TRIS/HCl (pH=7.4) e inibidores de protease, utilizando homogeneizador Polytron - modelo NT 136. As amostras foram homogeneizadas de 3 a 4 vezes, por cerca de 10 segundos, na temperatura de 4 °C e posteriormente, foram centrifugadas por 10 min na velocidade de 720 G à 4 °C.

O sobrenadante foi utilizado para avaliar produtos da peroxidação lipídica pelo método de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Após as amostras serem diluídas 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) foi adicionado, juntamente com 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA). Posteriormente as amostras foram mantidas em banho-maria e em

seguida foram imersas em gelo e 1 mL de TCA a 70% foi adicionado, passando depois por incubação em temperatura ambiente. Depois, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 540 nm (NEVES, 2019).

A concentração de tiol nas proteínas foi medida por redução de DTNB. A análise é realizada em duplicata, onde em cada tubo adiciona-se amostra, tampão, metanol e DTNB e no branco todos os reagentes anteriores, exceto DNTB. Após a etapa anterior as amostras passaram por incubação em temperatura ambiente e em seguinte centrifugadas. O sobrenadante com as concentrações das frações proteicas resultantes foi avaliado em espectrofotômetro a 562 nm (SKAFF; PATTISON; DAVIES, 2009).

DESENVOLVIMENTO

O exercício físico causa um aumento de consumo de oxigênio e perturbação do sistema redox, o que conseqüentemente gera um aumento de EROs. O músculo esquelético é conhecido como um potente gerador de EROs, o que pode causar estresse oxidativo em uma situação de exercício exaustivo. O estresse oxidativo pode causar danos oxidativos como desnaturação do DNA, indução de apoptose nas células e até mesmo indução de doenças neurodegenerativas (ROH; SO, 2017).

Na literatura há controvérsias sobre as fontes principais de produção de EROs no músculo esquelético. Sakellariou et al, 2013 citam como fontes principais de EROs a mitocôndria, NADPH Oxidase (NOXs) e a Xantina oxidase. Este ainda reforça que a NOXs e não a mitocôndria é que atuam como principal fonte de superóxido em fibras musculares. A NOXs é um complexo enzimático que catalisa a metabolização do oxigênio em superóxido e peróxido de hidrogênio. Esta possui duas proteínas intermembranares que formam o citocromo b558-oxidase e três subunidades citoplasmáticas, que são a p40phox, p47phox, p67phox, no qual, quando ativadas, produzem ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (DIKALOV, 2011).

Substâncias têm sido estudadas como inibidoras do complexo NADPH oxidase. Uma delas é a apocinina, composto orgânico capaz de bloquear a ligação da subunidade p47phox com as outras subunidades deste complexo enzimático, impedindo a formação da NOXs e conseqüentemente a formação de superóxido (BEDARD; KRAUSE, 2007). A apocinina foi descrita pela primeira vez em 1883, quando foi isolada da planta *Apocynum cannabinum* (maconha canadense). Estudos recentes apontam a apocinina como um dos mais seletivos inibidores da

NADPH oxidase, onde a ação dessa droga se dá após certo tempo com a formação de um dímero que de fato terá ação direta na inibição da formação do complexo enzimático.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Peroxidação lipídica (TBARS)

Os resultados indicaram que o exercício exaustivo aumentou significativamente a concentração de MDA comparado com o repouso (CE, $3,37 \pm 0,80$ vs. CR, $1,05 \pm 0,20$, $p < 0,05$). No entanto a apocinina não preveniu a ocorrência de estresse oxidativo no músculo sóleo induzido pelo exercício, pois a concentração de MDA foi maior entre os grupos AE e CE ($0,754 \pm 1,78$ vs. $3,37 \pm 0,80$, $p < 0,05$). Ainda, houve efeito da apocinina na concentração MDA no repouso (AR, $7,54 \pm 1,78$ vs. CR, $1,05 \pm 0,20$, $p < 0,05$). Dessa forma, pode-se observar que entre os grupos AR e AE houve diferença significativa, que pode ser um indicativo de que a apocinina preveniu o estresse nos animais do grupo AE, se comparados ao grupo AR.

2. Conteúdo do Grupamento Tiol

A produção excessiva das EROs pode resultar fisiologicamente em danos proteicos. Foi utilizada como técnica para quantificar as lesões em proteínas, o conteúdo de tióis totais (TT) não oxidado. O conteúdo de tiol, em nmol DTNB reduzido por mg de proteína dos músculos sóleo foi significativamente menor entre os grupos CE e CR. Contudo, quando se compara AE e AR os níveis de tiol reduzido deram significativamente maior. No entanto, não houve efeito da apocinina nos níveis de tióis reduzido no repouso (AR, $49,09 \pm 17,03$ vs. CR, $49,51 \pm 12,13$). Dessa forma, ao comparar o grupo CE e o AE, observa-se que houve efeito da apocinina no grupo Exercício e infere-se que houve inibição de dano oxidativo.

Ao avaliar o dano oxidativo através da peroxidação lipídica (TBARS) e níveis de tióis reduzidos foi observado que a apocinina preveniu a ocorrência de estresse oxidativo (RAHMAN, 2017) no músculo sóleo induzido pelo exercício, pois a concentração de MDA foi diferente entre os grupos. Porém, não houve efeito da apocinina na concentração MDA no repouso.

O músculo sóleo apresenta uma maior capacidade antioxidante (LOUREIRO *et al.*, 2016), talvez por apresentar maior atividade pró-oxidativa via NADPH o que justifica uma menor atividade antioxidante do grupamento tiol no grupo administrado com Apocinina

submetido ao exercício, sugerindo uma inibição da via NADPH oxidase. Assim como aponta Baümer (2009) que utilizou a apocinina para inibir a formação de superóxido via NADPH oxidase vascular.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a apocinina preveniu os danos oxidativos em situações de exercício agudo extenuante e pode ser considerado como um eficiente inibidor da produção de EROs no músculo esquelético.

REFERÊNCIAS

BAÜMER, A. T. *et al.* The NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin Improves Endothelial NO/Superoxide Balance and Lowers Effectively Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats: Comparison to Calcium Channel Blockade. **Clinical and Experimental Hypertension**. v. 29, 2007.

BEDARD K, KRAUSE KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**. 2007 Jan;87(1):245-313.

DIKALOV, S. Crosstalk between mitochondria and NADPH oxidases. **Free Radic Biol Med**. October 1; 51(7): 1289–1301. 2011.

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.

LOUREIRO, A.C.C. *et al.* Differential Expression of NADPH Oxidases Depends on Skeletal Muscle Fiber Type in Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2016.

NEVES *et al.*; Dynamic, Not Isometric Resistance Training Improves Muscle Inflammation, Oxidative Stress and Hypertrophy in Rats. **Frontiers of Physiology**. 2019.

PERÉZ *et al.*; Bryostatín-1 Synergizes with Histone Deacetylase Inhibitors to Reactivate HIV-1 from Latency. **Current HIV Research**. 2010.

POWERS SK, JI LL, KAVAZIS AN, JACKSON MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. **Compr Physiol**. 2011; 1:941–969.

RAHMAN, M.M *et al.* Apocynin prevented inflammation and oxidative stress in carbon tetra chloride induced hepatic dysfunction in rats. **Biomed Pharmacother**. 2017.

ROH, H-T.; SO, W-Y. The effects of aerobic exercise training on oxidant–antioxidant balance,

neurotrophic factor levels, and blood–brain barrier function in obese and non-obese men. **Journal of Sport and Health Science**. 2017.

SAKELLARIOU GK, VASILAKI A, PALOMERO J, KAYANI A, ZIBRIK L, MCARDLE A, JACKSON MJ. Studies of Mitochondrial and Nonmitochondrial Sources Implicate Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase(s) in the Increased Skeletal Muscle Superoxide Generation That Occurs During Contractile Activity. **Antioxidants & redox signaling** 18: 1-19, 2013.

SKAFF, O.; PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. Hypothiocyanous acid reactivity with low-molecular-mass and protein thiols: absolute rate constants and assessment of biological relevance. **The Heart Research Institute**. 2009.

STROBEL, N. et al.; Antioxidant Supplementation Reduces Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis. **American College of Sports Medicine**. 2011.