

ATIVIDADE DO COMPLEXO ENZIMÁTICO NADPH OXIDASE EM DIFERENTES TIPOS DE FIBRA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS APÓS EXERCÍCIO EXAUSTIVO

Paulo Elesson Guimarães de Oliveira¹; Luiz Henrique Pontes dos Santos¹; Denner Silvino da Silva¹; Isabele da Silva Pereira¹; Vânia Marilande Ceccato¹

Universidade Estadual do Ceará, paulo.elesson@gmail.com

¹Universidade Estadual do Ceará, luizhen-ricky@hotmail.com

Universidade Estadual do Ceará, denner.silvino@aluno.uece.br

Universidade Estadual do Ceará, bel06_silva@hotmail.com

Universidade Estadual do Ceará, vceccatto@yahoo.com.br

1- Introdução

NADPH oxidase é um complexo enzimático que catalisa a transferência de elétrons da NADPH à molécula de oxigênio através de suas subunidades catalíticas para gerar superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como demonstrado em alguns estudos (BEDARD; KRAUSE, 2007; DIKALOV, 2011). Em células fagocíticas liberam Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) como forma de defesa contra patogênicos, enquanto que em células não fagocíticas geram EROs como moduladores de vias de sinalização redox-sensitiva (POWERS, 2011; OLESEN et al, 2010; POWERS; JACKSON, 2008). Em uma situação inflamatória pós-exercício, por exemplo, os neutrófilos são recrutados para a remoção de proteínas danificadas e reparo do tecido danificado e liberam lisoenzimas e superóxido, processo esse conhecido como *burst* respiratório (POWERS, 2011).

Há controvérsias sobre a localização precisa de NADPH oxidase, mas a presença desta enzima tem sido relatada na membrana plasmática do músculo esquelético (JAVESGHANY, et al, 2002), retículo sarcoplasmático (RS) (XIA et al, 2003) e túbulos T (ETINOSA et al, 2006). A enzima localizada no túbulo T parece ser particularmente relevante, uma vez que tem sido reivindicada para ser especificamente ativado por contrações (ETINOSA et al, 2006).

O músculo esquelético, em geral, contém três tipos de fibras: de contração lenta ou fibras vermelhas (Tipo I) e contração rápida ou fibras brancas (Tipo II). Estes últimos são caracterizados por metabolismo glicolítico predominante, maior desenvolvimento RS, menor conteúdo mitocondrial e atividade fásica, enquanto as fibras vermelhas têm um metabolismo oxidativo predominante, com RS menos desenvolvimento, mais conteúdo mitocondrial e especializadas em atividades contráteis contínuas (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

Neste contexto, o músculo sóleo (SOL) é predominantemente fibra do Tipo I, o músculo gastrocnêmio vermelho (RG) é predominantemente Tipo IIa, o músculo gastrocnêmio branco (WG) Tipo IIa e o músculo Extensor Longo dos Dedos (ELD) é um complexo de fibras rápidas (FOWLES; GREEN OUYANG, 2004). As fibras musculares têm capacidade para adaptação fenotípica, expressão diferencial de isoformas, alteração da arquitetura muscular em resposta ao ambiente celular interno e externo (PETTE; STARON 2001).

Um estudo recente demonstrou diferenças significantes entre fibras de contração rápidas e lentas a respeito do metabolismo de EROs (LOUREIRO et al, 2016). Este trabalho tem como objetivo analisar a atividade do complexo enzimático NADPH oxidase em diferentes tipos de fibra no musculo esquelético de ratos após exercício exaustivo.

2- Metodologia

Aspectos éticos

O estudo foi produzido no Laboratório de Bioquímica e Expressão gênica submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará – UECE sob o número 5236655/2016.

Protocolo de exercício

Os animais do grupo exercício foram ambientados, por duas semanas, em uma esteira ergométrica para o uso em roedores (INBRAMED), no período noturno, aproximando-os das condições em 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, 2007).

A observação comportamental dos animais de recusa à atividade serviu como critério para possíveis pré-exclusões do estudo. Após duas semanas de adaptação, os grupos realizaram uma sessão de exercício 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 2007).

Eutanásia e Coleta de tecidos

Os animais foram eutanasiados 24 horas após o exercício, com Tiopental sódico (150mg/Kg) via intraperitoneal e sacrificados por decapitação. Amostras da porção vermelha e porção branca do músculo gastrocnêmio foram dissecadas, pesadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

Atividade da NADPH Oxidase

A atividade da NADPH Oxidase foi quantificada em frações microsomiais musculares pelo teste Amplex vermelho / peroxidase de rábano, que detecta a acumulação de um produto oxidado fluorescente. Para obter a fração microsomal, os homogeneizados de amostras musculares foram centrifugados a 3.000 G durante 15 min a 4 ° C. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 100 000 g durante 35 minutos a 4 ° C e o sedimento de P100 000 g foi suspenso em 0,5 ml de tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,2, contendo sacarose 0,25 M, MgCl₂ 2 mM, 5 mg / ml aprotinina e 34,8 mg / ml de fluoreto de fenilmetanossulfonilo (PMSF) e armazenados a -80 ° C até medições de geração de H₂O₂. A fração microsomal foi incubada em tampão fosfato de sódio 150 mM (pH 7,4), contendo SOD (100 U / ml; Sigma, EUA),

peroxidase de rábano (0,5 U / ml, Roche, Indianapolis, IN), Vermelho Amplex (50 uM; Sondas Moleculares, Eugene, OR), EGTA 1 mM na presença ou ausência de NADPH 1 mM. A fluorescência foi imediatamente medida em um leitor de microplacas (Victor X4; PerkinElmer, Norwalk, CT) a 30 ° C, utilizando excitação a 530 nm e emissão a 595 nm (FORTUNATO et al, 2010). A atividade específica de NADPH Oxidase foi calculada pelas diferenças entre as atividades na presença e ausência de NADPH. A atividade enzimática específica foi expressa como nmol H₂O₂ por hora por miligrama de proteína (nmol.h⁻¹.mg⁻¹). A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford et al, (1976).

3- Resultados e Discussão

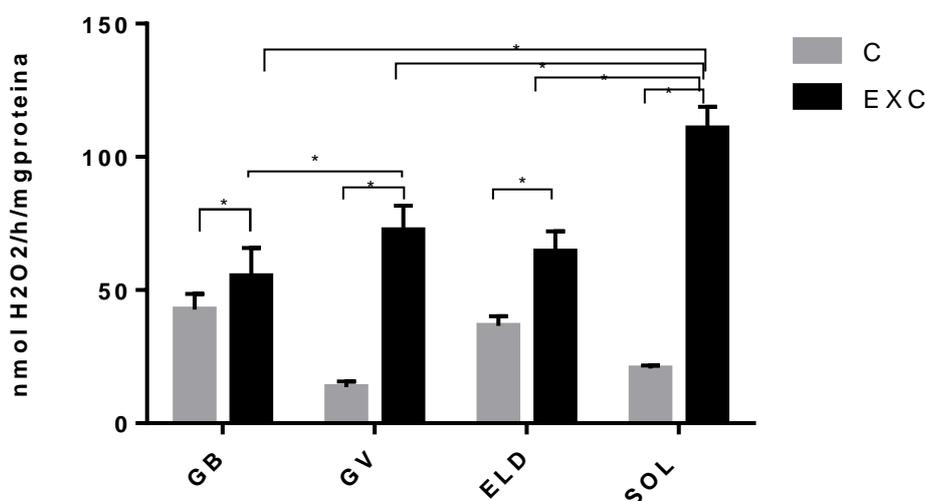


Figura 1 - Atividade da NADPH Oxidase atividade. Gastrocnêmio branco (GB), gastrocnêmio vermelho (GV), Extensor Longo dos dedos (ELD), Sóleo (SOL). Os dados são expressos como média ± desvio padrão * p < 0,05.

O grupo EXC apontou um aumento significativo da atividade de NADPH Oxidase no músculo GV (72,47 ± 3,8 p < 0,05) quando comparado com o grupo controle (13,67 ± 3,8 p < 0,05). Assim como no grupo EXC do músculo GB (55,24 ± 3,8 p < 0,05) comparado com o Controle (42,64 ± 3,8 p < 0,05). O mesmo aconteceu no músculo ELD, o grupo EXC apontou um aumento significativo da atividade de NADPH Oxidase (64,50 ± 3,8 p < 0,05) quando comparado com o grupo controle (36,62 ± 3,8 p < 0,05), assim como no músculo SOL, com um aumento significativo no grupo EXC (110,6 ± 3,8 p < 0,05) comparado com o grupo controle (20,58 ± 3,8 p < 0,05).

A atividade da NADPH oxidase foi comparada entre os diferentes tipos de fibra (glicolíticas e oxidativas). A atividade da NADPH Oxidase foi significativamente maior no músculo SOL (p < 0,05) em comparação com os músculos RG, WG e ELD. Ainda, a atividade de NADPH Oxidase apontou um aumento significativo no músculo GV (p < 0,05) quando comparada ao músculo GB.

O músculo Sóleo é classificado como um músculo com predomínio de fibras do tipo I, o músculo gastrocnêmio vermelho com fibras do tipo IIa (intermediário), e o músculo gastrocnêmio branco com fibras do tipo IIb (FOWLES; GREEN; OUYANG, 2004). O músculo RG foi caracterizado como fibras de contração mais lenta, ricos em mioglobinas e enzimas oxidativas, capazes de sustentar atividades contínuas. O músculo GB possui atividade metabólica rápida, de predomínio glicolítico. Assim, as porções vermelha e branca do músculo gastrocnêmio diferem no papel relativo da glicólise e da fosforilação oxidativa (PICARD et al, 2012). Diante destas diferenças encontradas nos tipos de fibra do músculo esquelético quanto à atividade da NADPH oxidase, podemos sugerir uma relação com às características contráteis de cada fibra e provavelmente à maior disponibilidade intracelular de cálcio durante a contração, o que foi crucial para sustentar a contração muscular neste protocolo de exercício utilizado no estudo.

Conclusão

Para concluir, o complexo NADPH Oxidase parece ter uma influência maior em fibras de perfil oxidativo no musculo esquelético. Ainda, os músculos glicolíticos e oxidativos podem ter vias de sinalizações diferentes para as adaptações do músculo esquelético ao exercício, sugerindo a importância da intensidade e duração do exercício em respostas adaptativas, uma vez que estas variáveis influenciam o estado redox.

Referências

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 7: 72: 248-254, 1976.

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

FOWLES, J. R; GREEN, H. J; OUYANG, J. Na⁺-K⁺-ATPase in rat skeletal muscle: content, isoform, and activity characteristics. **J Appl Physiol.** 96: 1: 316-26, 2004.

FORTUNATO, R. S; LIMA DE SOUZA, E. C; AMEZIANE-EL HASSANI, R; BOUFRAQECH, M; WEYEMI, U; TALBOT, M; LAGENTE-CHEVALLIER, O; DE CARVALHO, D. P; BIDART, J. M; SCHLUMBERGER, M; DUPUY, C. Functional consequences of dual oxidase-thyroperoxidase interaction at the plasma membrane. **J Clin Endocrinol Metab.** 95: 12: 5403-11, 2010.

FOWLES JR, GREEN HJ, OUYANG J. Na⁺-K⁺-ATPase in rat skeletal muscle: content, isoform, and activity characteristics. **J Appl Physiol** , 2004.

KREGEL, K. C; ZHANG, H. J. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 292: 1: R18-36, 2007.

LOUREIRO A.C.C. REGO-MONTEIRO, I.C, HORTENZI, V.H; AGUIAR, A.P; ABREU, E.S; ALBUQUERQUE, J.P.C; HETCHI, F; OLIVEIRA, A.C; CECCATTO, V.M; FORTUNATO, R.S;

CARVALHO,D.P. Differential expression of nadph oxidases depends on skeletal muscle fiber type and exercise training in rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.

OLESEN J, KIILERICH K, PILEGAARD H. PGC-1 α -mediated adaptations in skeletal muscle. **Pflugers Arch - Eur J Physiol**, 2010.

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.

POWERS SK, CRISWELL D, LAWLER J, JI LL, MARTIN D, HERB RA, DUDLEY G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am J Physiol RegulIntegr Comp Physiol**, 1994.

POWERS SK, CRISWELL D, LAWLER J, JI LL, MARTIN D, HERB RA, DUDLEY G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am J Physiol RegulIntegr Comp Physiol**, 1994.

POWERS SK, JACKSON MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. **Physiol Rev** 88: 1243–1276, 2008.

POWERS, S. K; JI, L. L; KAVAZIS, A. N; JACKSON, M. J. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. **Compr Physiol**. 1: 2: :941-969, 2011.

SCHIAFFINO, S; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiol Rev**. 91: 4: 1447-1531, 2011.