

Determinação da Expressão dos Genes Envolvidos na Defesa e Reparo do Músculo Esquelético de Rato Submetidos a Exercício de Alta Intensidade

Autores

Ivy Aline Gordon Leme

Orientador

Rozangela Verlengia

Apoio Financeiro

Pibic

1. Introdução

Os músculos esqueléticos possuem a capacidade de gerar força (e potência) sem sofrer lesão. Entretanto, se for transmitida muita força através de uma unidade musculotendinosa, além do que esta suporta, algumas regiões dessa unidade poderão ser lesadas. Em resposta a estas alterações de estresse que acometem o organismo, tem-se o desencadeamento de mecanismos de defesa e mecanismos de reparo.

- **Mecanismo de Defesa Antioxidante**

No organismo há sistemas antioxidantes que protegem direta e indiretamente todas as células de danos oxidativos que podem causar lesões, e podem ser divididos em antioxidante não-enzimático e enzimático.

Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX). A atividade e a expressão dessas enzimas parecem ser moduladas pela concentração de EROs produzida durante os exercícios (GANDRA et al., 2004). Elas são fabricadas pelo músculo e degradam seletivamente espécies moleculares individuais.

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos protéticos em sua composição, ela atua sobre o radical superóxido convertendo-o em peróxido de hidrogênio. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD: Um forma citosólica, SOD-Cu/Zn, presente principalmente no citosol, que contém o íon cobre (Cu) no seu sítio ativo, o qual participa da reação, e o íon zinco (Zn), que tem função de estabilização molecular; e outra localizada primariamente na mitocôndria, a SOD-Mn, que possui o íon manganês em seu sítio ativo, que participa na reação de dismutação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

- **Mecanismo de Reparo (proteínas de choque térmico)**

O estresse térmico ou químico, por exemplo, gerado a partir do exercício físico, induzem aumentos na produção de uma classe de proteínas denominadas de proteínas de choque térmico ou Heat Shock Proteins (HSP). Estruturalmente as HSPs são altamente conservadas, desde os seres primitivos (procariontes) até o homem. Tais proteínas podem ser agrupadas em famílias, de acordo com suas seqüências de aminoácidos e com seus pesos moleculares (em kD- quilodalttons), ou seja, de acordo com suas funções e tamanhos. Com relação ao tamanho, elas podem ser determinadas pelo método SDSPAGE (eletroforese em gel de poliacrilamidasódio-dodecil-sulfato) (FULLER et al., 1994).

Diversos tipos de estresses metabólicos afetam de modo descontrolado, a conformação correta e, conseqüentemente, a função das proteínas. Nas condições em que as proteínas incorretamente dobradas se acumulam nas células, começa uma resposta ao estresse, ou Heat Shock Response (HSR). Esta se inicia pela ativação de um fator específico de transcrição, chamado HSF-1 (Heat Shock Factor, ou fator do choque térmico). Tal fator estaria presente na célula normal na forma de monômero inativo e em resposta ao estresse metabólico, rapidamente sofreria trimerização, o que tornaria possível sua ligação imediata a uma seqüência de nucleotídeos, chamada de elemento do choque térmico ou do inglês Heat Shock Element (HSE), localizada dentro da região promotora dos genes que codificam as HSP, tudo resultando em alto nível de transcrição dos genes das proteínas do choque térmico (MEYER; SILVA, 1999).

Contudo, as proteínas de choque térmico não são somente induzidas sob condições de estresse. Há componentes desta classe de proteínas, conhecidas como HSC (Heat Shock Cognates), que são expressos de modo constitutivo, isto é, dentro da vida normal dos organismos não submetidos a condições de estresse. As formas cognatas não são idênticas às formas indutíveis; estas, quando surgem, somam quantidades muito maiores do que aquelas constitutivas (MEYER; SILVA, 1999).

Essas proteínas são componentes importantes para proteção celular, promovendo efeitos de proteção citoesquelética contra danos do tecido muscular esquelético induzido pela contração (McARDLE et al., 2002). O principal mecanismo de ação do qual conferem proteção, seria o de agirem como “chaperonas” moleculares. Chaperona designa substâncias que, sem fazer parte da estrutura final de proteínas, evitam interações incorretas entre estas, auxiliam na montagem final das mesmas assim como em sua síntese, facilitam o dobramento correto de proteínas recém sintetizadas e suas translocações para os compartimentos celulares.

A HSP-70 é a mais abundante HSP induzida nas células em resposta ao estresse e, além disso, também é a mais conservada filogeneticamente. São as componentes da família de proteína de 70 kDa, um grupo de proteínas intimamente relacionadas que inclui HSP72, HSP73, GRP78 e GRP75. Todas elas partilham da mesma propriedade de ligação ATP, mas têm uma distribuição subcelular diferente dentro da célula (HERNANDO; MANSO, 1997). As HSP72 e HSP73 foram localizadas dentro do citoplasma e núcleo; a HSP73 é constitutivamente expressa enquanto que a HSP72 é geralmente sintetizada em resposta ao estresse (HERNANDO; MANSO, 1997) com função de manter e reparar a conformação protéica (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Seus pesos moleculares são similares, mas os padrões de indução e expressão são distintos (MEYER; SILVA, 1999).

A indução da síntese das proteínas de estresse foi observada após a exposição de células mamíferas a uma

variedade de condições, tais como a hipertermia, a privação de glicose, concentração intracelular aumentada de íon e cálcio, estresse oxidativo, hipóxia, bem como outros tipos de estresses metabólicos (HERNANDO; MANSO, 1997). Pode-se sugerir que a hipertermia do músculo é um dos fatores críticos para início de resposta ao estresse, tanto direta como indiretamente, através de perda relativa à temperatura de controle respiratório associada com produção aumentada de radicais livres de derivados de oxigênio; contudo, aumentos dos níveis de HSP70 durante o exercício são independentes da temperatura do corpo, sugerindo que outros fatores além do estresse térmico podem contribuir para a indução de proteínas de estresse durante o exercício (HERNANDO; MANSO, 1997).

2. Objetivos

O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão dos genes relacionados ao mecanismo de defesa e reparo desencadeados após exercício de exaustão (corrida) no músculo esquelético de ratos.

3. Desenvolvimento

Foram analisados por meio da Técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a expressão gênica da proteína de choque térmico (HSP 72) e da enzima antioxidante SOD-Mn no músculo sóleo de ratos machos Wistar, sedentários, submetidos a um protocolo de exercício de corrida em esteira até exaustão (Tabela 1 em anexo). Os grupos de animais foram sacrificados imediatamente, 1, 2, 4, e 8 horas após o término do exercício (n= 6).

4. Resultados

Determinação da Expressão Gênica

Proteína de Choque Térmico (HSP72)

A indução da síntese das proteínas de estresse é observada após a exposição de células a uma variedade de condições, tais como a hipertermia, a privação de glicose, concentração intracelular aumentada de íon e cálcio, estresse oxidativo, hipóxia, bem como outros tipos de estresses metabólicos como o exercício físico (HERNANDO; MANSO, 1997).

Um aumento de 50,2% foi observado 4 horas após o término do exercício em relação ao grupo controle. Por outro lado uma diminuição na expressão gênica foi constatada no período de 8 horas com diferenças estatísticas significativas em relação aos grupos de 1 horas (26,4 %); 2 horas (25,6%) e 4 horas (44,2%) (Figura 1, em anexo).

Na literatura o aumento da HSP72 tem sido relatado após exercício físico, possivelmente por este provocar estresses térmico e/ou químico, que induzem aumentos na produção dessa classe de proteínas (proteínas de choque térmico). HSP72 é geralmente sintetizada em resposta ao estresse (HERNANDO; MANSO, 1997) com função de manter e reparar a conformação protéica (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Smolka et al (2000) analisou a HSP72 por Western blotting em músculo sóleo de ratos Wistar sedentários submetidos a exercício agudo e constatou um aumento significativo de 97% da proteína, após 2 horas do término do mesmo em relação aos ratos sedentários não exercitados. Resultados estes que mostram similaridades com os dados do presente estudo, embora o período do pico de aumento da expressão da proteína tenha ocorrido em diferente período. Porém, é importante destacar que o dado por ele analisado refere-se à quantidade de proteínas, diferentemente do que se avaliou no presente estudo.

Outro estudo que também relata aumento do nível de HSP70 (HSP73/HSP72), embora tenha sido realizado em humanos, é o de Thompson et al (2003), que analisa o músculo vasto lateral em sujeitos não treinados, realizando exercício excêntrico (corrida em esteira por 30 minutos com 10º de declive). Encontrando um

aumento de 206% de HSP 70 no músculo vasto lateral após 48 horas do término do exercício.

Tanto os exercícios excêntricos como os concêntricos causam danos às fibras musculares, porém em diferentes proporções. O tipo mais lesivo à célula é o excêntrico. Provavelmente, Thompson encontrou uma porcentagem tão elevada de aumento da HSP72 devido ao fato de ter sido realizado um protocolo de exercício excêntrico, com a esteira em declive, diferentemente do realizado na presente proposta.

- Enzima Antioxidante (SOD-Mn)

A SOD-Mn atua sobre o radical superóxido convertendo-o em peróxido de hidrogênio. Possivelmente sua produção fica maior devido ao aumento do consumo de oxigênio em decorrência do aumento de trabalho muscular produzido pelo exercício físico, assim como à ativação de vias metabólicas específicas, resultando na formação de radicais livres de oxigênio, conhecidos como radicais livres, os quais se apresentam aumentados principalmente nos exercícios agudos e de curta duração (de alta intensidade) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Aumento de 73% do nível de expressão da SOD-Mn foi observado no período de 4 horas após o exercício quando comparado com o controle, 105,4% em relação a 1 hora e 105,3% em relação a 2 horas. Entretanto após 8 horas do término do exercício constata-se uma diminuição de 31,4 % em relação ao controle, 43,6% em relação ao imediato e 61,2% em relação a 4 horas. Constatou-se também uma diminuição de 29,2% no período de 1 hora após o exercício em relação ao imediato (Figura 2, em anexo).

Hollander et al (2001) encontrou aumento da SOD-Mn, ao fazer a análise do músculo vasto lateral profundo (VLP) e do vasto lateral superficial (VLS) de ratos fêmeas Sprague-Dawley, que foram submetidos a exercício de corrida com velocidade de 25m/min em esteira com inclinação de 5°, até os animais entrarem em exaustão (~1 hora), semelhantemente ao proposto na presente pesquisa, com a diferença de que nesta a inclinação da esteira era de 10° e os ratos entraram em exaustão em cerca de 40 minutos. A extração dos músculos ocorreu em períodos pré-determinados de 0, 1, 2, 4, 10, 24 e 48 horas após o exercício exaustivo. E após a análise, constatou-se um aumento significativo do mRNA da SOD-Mn no músculo VLP nos períodos de 0, 1 e 2 horas após o exercício.

Apesar de o aumento da enzima não ter sido encontrado pelos dois estudos exatamente no mesmo período, ambos os resultados indicam que a atividade da SOD-Mn aumenta durante as primeiras horas (em média de 4 horas) após o término da exaustão, diferenças estas que podem estar relacionadas com o tipo de músculo avaliado.

5. Considerações Finais

O exercício físico agudo proposto e executado, em esteira com inclinação de 10 graus e velocidade de 25 metros por minuto, promoveu a modulação da expressão gênica tanto da enzima antioxidante (SOD-Mn) quanto da HSP72, sistema de defesa e reparo, respectivamente. Respostas estas, possivelmente desencadeadas pela liberação de agentes agressores (como concentração intracelular aumentada de íon e cálcio, estresse oxidativo pelos radicais livres, hipóxia e hipertermia) induzidos pelo exercício de exaustão.

Referências Bibliográficas

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 43, n. 1, 1997.

FULLER, K.J.; ISSELS, R.D.; SLOSMAN, D.O.; GUILLET, J.G.; SOUSSI, T.; POLLA, B.S. Cancer and the heat shock response. **Eur. J. Cancer**, 1994

GANDRA, P.G.; ALVES, A.A.; MACEDO, D.V. de; KUBOTA, L.T. Electrochemical determination of antioxidant capacity for physical exercise evaluation. **Quím. Nova**, v.27, n.6, p.980-985, 2004.

HERNANDO, R.; MANSO, R. Muscle fibre stress in response to exercise: synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. **Eur. J. Biochem.**, n. 243, p.460-467, 1997.

HOLLANDER, J.; FIEBIG, R.; GORE, M.; OOKAWARA, T.; OHNO, H.; JI, L.L. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. **Eur. J. Physiol.**, 442:426-434, 2001.

McARDLE, A.; Vasilaki, A. et al. Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. **Ageing Res. Rev.**, v.1, n.1, p.79-93, 2002.

MEYER, T. N.; SILVA, A. L. da. Resposta celular ao estresse. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.45, n.2, p.181-188, 1999.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A. R. de. Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and

adaptation to the physical training. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.10, n.4, p.308-313, 2004.

SMOLKA,M.B.; ZOPPI,C.C.; ALVES,A.A.; SILVEIRA,L.R.; MAGANGONI,S.; SILVA,L.P. da; NOVELLO,J.C.; MACEDO,D.V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **Am. J. Physiol Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, R1539-R1545, 2000.

THOMPSON, H.S.; MAYNARD, E.B.; MORALES,E.R.; SCORDILIS,S.P. Exercise-induced HSP27, HSP70 and MARK responses in human skeletal muscle. **Acta Physiol Scand**, p.61-72, 2003.



