



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

JULIANA OSÓRIO ALVES

**EFEITO DA APOCININA NO BALANÇO REDOX NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS APÓS EXERCÍCIO EXTENUANTE AGUDO**

FORTALEZA-CEARÁ
2020

JULIANA OSÓRIO ALVES

EFEITO DA APOCININA NO BALANÇO REDOX NO MÚSCULO ESQUELÉTICO
DE RATOS APÓS EXERCÍCIO EXTENUANTE AGUDO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Fisiológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração: Ciências Biológicas II

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Marilande Ceccatto.

FORTALEZA-CEARÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Alves, Juliana Osorio.

Efeito da apocinina no balanço redox no músculo esquelético de ratos após exercício extenuante agudo [recurso eletrônico] / Juliana Osorio Alves. - 2020.

74 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Doutorado, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Vânia Marilande Ceccatto..

1. musculo esqueletico. 2. apocinina. 3. estresse oxidativo. 4. exercício extenuante. I. Título.

JULIANA OSÓRIO ALVES

EFEITO DA APOCININA NO BALANÇO REDOX NO MÚSCULO ESQUELÉTICO
DE RATOS APÓS EXERCÍCIO EXTENUANTE AGUDO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Fisiológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração: Ciências Biológicas II.

Aprovada em: 20/02/2020.

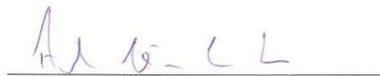
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Vânia Marilande Ceccatto
Universidade Estadual do Ceará-UECE

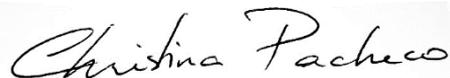


Profa. Dra. Stela Mirla da Silva Felipe
Universidade Estadual do Ceará-UECE



Profa. Dr. Adriano César Carneiro
Loureiro

Universidade Estadual do Ceará-UECE



Profa. Dra. Christina Pacheco
Universidade Estadual do Rio Grande
do Norte-UERN



Profa. Dr. Alex Soares Marreiros Ferraz
Universidade Federal do Ceará -UF

Dedico essa tese aos meus pais José e
Ana Lúcia, aos meus irmãos Ana Clara,
Weston e Felipe.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu guia, minha força, meu alicerce.

À minha orientadora, profa. Dra. Vânia Marilande Ceccatto, pela paciência e confiança que deposita em mim. Você é exemplo de mulher, professora, orientadora, pesquisadora e levarei pra sempre todo o aprendizado adquirido até aqui. Obrigada por tanto!

Aos meus pais, José Ribamar e Ana Lúcia, minha base e fortaleza. Pelo melhor ensinamento que alguém poderia receber, o exemplo. Exemplo de amor, união, respeito, caráter, enfim, todos os ensinamentos que fizeram parte da minha criação e foram fundamentais para a minha formação pessoal e profissional. Pai e Mãe, obrigada por sempre acreditarem em mim e não medir esforço para realização de meus sonhos. Nada disso seria possível sem o amor e confiança de vocês.

Aos meus irmãos, Weston, Felipe e Ana clara, minhas melhores companhias desde sempre. Aprendi e aprendo muito com vocês, amo cada diferença entre nós.

À minha família, exemplo de união e generosidade. Aos meus tios, que sempre ajudaram em toda minha trajetória nos estudos. Em especial, aos meus Tios Lustosa, Graça, Nonato e toda família do Rio de Janeiro que me recebeu com tanto carinho e cuidado, e indiretamente ajudaram a concluir os experimentos desta tese.

Ao meu amor, Luiz Henrique, pelo apoio e incentivo desde o início da pós-graduação, pelo companheirismo e aprendizado diário. Pela PACIÊNCIA, em todos os momentos difíceis (e foram muitos). Em cada etapa, você foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

À minha segunda família, João Bosco, Maria Gorete e Luciana, por me deixarem fazer parte da família de vocês e ajudado em todos os momentos que precisei.

A todos os amigos do Laboratório de Bioquímica e Expressão Gênica (LABIEX) que já passaram por lá e os que ainda formam essa grande equipe a qual tenho orgulho de fazer parte. Todos vocês foram fundamentais para o meu aprendizado e amadurecimento acadêmico: Alex, André, Fleury Jr, Igor, Naísa, Natália, Isabel, Lucas, Tanes, Aline, Chris, Stela, Sávio, Isabele, Jonathan, Jefferson, Karla Camila, Sérgio, Welton e Raquel. Em especial, aos meus queridos alunos de iniciação científica, Paulo, Denner e Maria

Alice. Obrigada por tanto, vocês contribuíram não somente para a construção dessa tese, mas para minha construção como professora e orientadora.

Aos colegas e colaboradores do Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB) pela ajuda e apoio nos experimentos. Ao Prof. Rodrigo Fortunato, por ter me recebido no laboratório de Fisiologia e Sinalização Redox da UFRJ e colaborado com o presente estudo. Em especial, ao Leonardo Matta pela recepção e ajuda nos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico (FUNCAP).

Sonhos determinam o que você quer.
Ações determinam o que você conquista.

(Aldo Novak)

RESUMO

O exercício físico quando realizado até a exaustão gera alteração da homeostase, consequentemente produzindo uma quantidade maior de espécies reativas de oxigênio (ERO). Atualmente, evidências sugerem que as ERO desempenham papel benéfico e estão associadas às adaptações estruturais e funcionais das células, por meio de regulação de vias de sinalizações celulares. A NADPH oxidase (Nox) é um complexo enzimático especializado em produzir ERO. A administração da apocinina pode ajudar a revelar a fonte principal da geração de ERO no músculo esquelético. O objetivo do estudo foi analisar o efeito da apocinina no balanço redox no músculo esquelético de ratos após exercício extenuante. O estudo é composto por dois subprojetos: subprojeto 1 e subprojeto 2. O subprojeto 1: Com 2 grupos experimentais Controle (CTL) e Exercício (EXC). O exercício exaustivo foi realizado em esteira rolante, com protocolo progressivo até a exaustão no grupo (EXC). Foram quantificados na porção branca (GB) e vermelha (GV) do gastrocnêmio e no sóleo (SOL): níveis de mRNA de componentes da família Nox presentes no tecido muscular, bem como a atividade desse complexo enzimático; marcadores de estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes. O Subprojeto 2 é composto por 4 grupos experimentais: controle (CTL; n=8), exercício (EXC; n=8), apocinina (APO; n=8) e apocinina-exercício (APO-EXC; n=8). O protocolo de exercício extenuante foi o mesmo utilizado do subprojeto 1. Nos grupos APO e APO-EXC foi administrada 30 mg/kg/dia (gavagem) em três dias seguidos. Foram quantificados no músculo sóleo: os níveis de mRNA de componentes da família Nox presentes no tecido muscular, bem como a atividade desse complexo enzimático; marcadores de estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes. Os resultados do subprojeto 1 indicaram que a atividade de Nox apresentou valores mais altos no músculo SOL em comparação às porções RG e WG. O mesmo ocorreu com os níveis de mRNA de Nox2 e Nox4, atividades enzimáticas antioxidantes e conteúdo de glicogênio. Vinte e quatro horas após sessão de exercício exaustivo, a expressão de Nox aumentou nas fibras oxidativas de contração lenta. A condição de exercício extenuante agudo mostrou atenuação do estresse oxidativo e aumento da atividade antioxidante através da ativação do gene *Ppargc1a*, adaptações de defesa antioxidante e expressão gênica diferencial de acordo com o tipo de fibra predominante. Os resultados do subprojeto 2 indicaram que os níveis de p47phox aumentaram significativamente com o exercício exaustivo agudo no músculo sóleo. Ainda, o exercício aumentou significativamente o complexo de montagem Nox2. A ativação de Nox2 e Nox4 induzida pelo exercício foi inibida pelo tratamento com apocinina. Como esperado, o exercício aumentou os níveis de mRNA da superóxido dismutase de manganês (MnSOD), glutathione peroxidase (Gpx) e catalase (Cat) no músculo esquelético. Além disso, o aumento dos TBARS induzidos pela diminuição do exercício em ratos tratados com apocinina em comparação com o grupo exercitado pelo veículo e os níveis reduzidos de tiol aumentaram nos ratos tratados com apocinina. Em conclusão, a inibição de Nox2 pela apocinina altera a sinalização intracelular no exercício e os estímulos elétricos musculares, sugerindo que o Nox2 desempenha um papel crítico na resposta molecular ao exercício agudo.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Apocinina. Estresse oxidativo. Exercício extenuante.

ABSTRACT

Physical exercise when performed until exhaustion can lead to homeostatic changes, which increases metabolism, consequently increase in oxygen reactive species (ROS) production. Currently, evidence suggests that ROS play a beneficial role and are associated with the structural and functional cell adaptations, through cellular signaling regulation pathways. NADPH oxidase (NOX) is a enzymatic complex specialized in ROS production. Apocynin (NADPH oxidase inhibitor enzyme) administration can help reveal the main source of ROS generation in skeletal muscle. This study aims analyses apocynin effect in redox balance of rat skeletal muscle after strenuous exercise. This study was composed by two subprojects: subproject 1: 2 experimental groups, control (CTL) and exercise (EXC). Strenuous exercise was performed in treadmill, with a progressive protocol until exhaustion of the group (EXC). Were quantify in gastrocnemius white portion (GW) and red (GR) and soleus (SOL): mRNA levels of Nox family components present in muscle tissue, as well the enzymatic activity of this complex; oxidative stress markers and antioxidant enzyme activity. Subproject 2 is composed by 4 experimental groups: control (CTL; n=8), exercise (EXC; n=8), apocynin (APO; n=8) e apocynin-exercise (APO-EXC; n=8). Following the same strenuous exercise protocol used in subproject 1. In APO and APO-EXC groups was administrated 30 mg/kg/day (gavage) in three days in row. Soleus muscle was quantified: mRNA levels of NOX family components present in muscle tissue, as well the enzymatic activity of this complex; oxidative stress markers and antioxidant enzyme activity. Subproject1 results indicated that Nox activity showed higher values in the SOL muscle compared to the RG and WG portions. The same occurred with NOX2 and NOX4 mRNA levels, antioxidant enzyme activities and glycogen content. Twenty-four hours after an exhaustive exercise session, Nox expression increased in oxidative fibers of slow twitch. Acute strenuous exercise condition showed attenuation of oxidative stress and increased antioxidant activity through Ppargc1a gene activation, adaptations of antioxidant defense and differential gene expression according to the predominant fiber type. Subproject 2 results indicated significant increase in p47phox levels in soleus muscle submitted acute exhaustive exercise. In addition, the exercise significantly increased Nox2 assembly complex . Nox2 and Nox4 exercise-induced activation was inhibited by treatment with apocynin. As expected, exercise increased levels of manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) mRNA levels in skeletal muscle. In addition, TBARS increase induced by decreased exercise in apocynin treated rats compared to exercised group by the vehicle and reduced levels of thiol increased in rats treated with apocynin. In conclusion, the Nox2 inhibition by apocynin alters intracellular signaling in exercise and electrical muscle stimuli, suggesting that Nox2 plays a critical role in the molecular response to acute exercise.

Key-words: Skeletal muscle. Apocynin. Oxidative stress. Strenuous exercise.