

RESPOSTA CURSO-TEMPORAL DA ENZIMA CATALASE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS APÓS UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO EXAUSTIVO
(TIME-COURSE RESPONSE OF CATALASE ENZYME IN SKELETAL MUSCLE OF RATS AFTER EXHAUSTIVE EXERCISE SESSION)

Sávio Victor Diógenes Mendes; Luiz Henrique Pontes dos Santos; Juliana Osório Alves; Isabele da Silva Pereira; Christina Pacheco; Vânia Marilande Ceccatto*
Universidade Estadual do Ceará

ABSTRACT

Studies show that exhaustive exercise prints in an imbalance between free radicals and antioxidant defense system. One of the enzymes responsible for the defense system is catalase (CAT) which detoxifica hydrogen peroxide in skeletal muscle avoiding possible damage. The aim of this study was to assess the time course of response catalase in skeletal muscle of mice after an exhaustive exercise session. They used 36 male Wistar rats with 60 days old and weighing 220-240g, kept in light / dark 12h / 12h with water and food *ad libitum*. The animals were divided into six groups: control group; immediately after exercise (0h); 6h; 12h; 24h; 48 hours after exercise. These have been adapted for two weeks on a treadmill for 48 hours after the animals and adaptation undergo a workout. The portions of red gastrocnemius muscle were dissected and stored in liquid nitrogen. The gene expression analysis was performed by PCR in real time. To analyze the enzymatic activity of CAT, the cultures were placed in a spectrophotometer at the absorbance value at 240 nm. The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA - oneway) and post Tukey test ($p < 0.05$). The results showed large capacity regulation of this antioxidant enzyme, indicating a significant increase in expression of CAT 6h after exercise ($p < 0.05$), as well as enzyme activity also increased by 6 hours after exercise ($p < 0.05$) compared with the control, concluding that in the first hour after exercise has been possible to identify a defense response in skeletal muscle after exhaustive exercise.

KEYWORDS: Exhaustive Exercise; Catalase; Skeletal muscle

INTRODUÇÃO

A inatividade física é o quarto maior fator de risco de morte para a população mundial (WHO, 2014), implicando na prevalência nos números de casos de Doenças Crônicas Degenerativas, crescendo também o número de estudos que sustentam e descrevem os benefícios do exercício físico para promoção da saúde. (ARAÚJO & ARAÚJO, 2000). Estudos evidenciam que exercício extenuante imprime um estresse oxidativo no organismo, decorrente de um desequilíbrio entre os radicais livres e o sistema de defesa antioxidante, entretanto este estado é revertido quando o organismo se adapta e aumenta sua defesa, contribuindo para um estado de equilíbrio redox (SCHNEIDER et al., 2009; BARBOSA et al., 2010).

Estudos apontam que a atividade da enzima catalase no músculo esquelético

aumentou em resposta ao exercício crônico (POWERS & JACKSON, 2008; SCHNEIDER et al., 2009), porém pouco se sabe como esta enzima antioxidante age após uma sessão de exercício exaustivo. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi analisar a resposta curso temporal da enzima catalase no músculo esquelético de ratos após uma sessão exaustiva de exercício físico.

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Exercício

Radical livre é definido como um átomo ou molécula com elétrons desemparelhados em sua última camada de elétron, o que pode causar alta reatividade a molécula, podendo oxidar proteínas, lipídios de membrana e até mesmo ácidos nucleicos como DNA e RNA. (BARBOSA et al., 2010)

Dentre as EROs produzidas na metabolização do O₂ estão os radicais Superóxido, Hidroxila, Hidroperóxido, e o não-radical Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂). O Peróxido de Hidrogênio mesmo não sendo um radical, é um metabólito deletério que pode

*Autor correspondência: vania.ceccatto@uece.br
Resumo em Português disponível no Suplemento

transpassar camadas lipídicas, inclusive reagir com a membrana eritrocitária e proteínas associadas ao Ferro, oxidando qualquer estrutura celular ou molécula próxima. O peróxido de hidrogênio possui meia vida longa quando comparado com as demais EROs e sua toxicidade aumenta drasticamente na presença de ferro (BIANCHI & ANTUNES, 1999; BARBOSA et al., 2010). Quando há um desequilíbrio entre os radicais livres e o sistema antioxidante este fenômeno é conhecido como estresse oxidativo, o qual pode ser gerado por situações fisiológicas e não fisiológicas. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007)

O organismo, na tentativa de conter os efeitos nocivos do estresse oxidativo, libera diversos compostos antioxidantes. O sistema defesa antioxidante pode ser: enzimático e não enzimático. O sistema enzimático, abordado neste trabalho, é composto, entre outros, das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPX), que convertem as EROs em moléculas estáveis não oxidantes, evitando as reações em cadeia que dão origem aos danos oxidativos. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; POWERS & JACKSON, 2008; BARBOSA et al., 2010). A Catalase é uma Hemoproteína citoplasmática, encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim, fígado, além do músculo esquelético que atua convertendo o Peróxido de Hidrogênio em H₂O e O₂. (GOODSELL, 2004)

METODOLOGIA

O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará – UECE sob o número 3145789/2014. Foram utilizados 36 ratos machos albinos da linhagem Wistar com 60 dias de vida e peso médio de 220-280g, 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*. Os animais foram divididos em seis grupos experimentais, controle (C), eutanasiados logo após o exercício (0h), 6h, 12h, 24h e 48h.

Os animais foram ambientados, por duas semanas, em uma esteira ergométrica para o uso de roedores, no período noturno. Após duas semanas de adaptação, os grupos experimentais (exceto o grupo controle) realizaram uma sessão de exercício exaustivo que consistiu 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. A eutanásia foi feita por Dióxido de Carbono (CO₂) 0h, 6h, 12h, 24h e 48 horas após o exercício e porções do gastrocnêmio vermelho foram dissecadas e armazenadas em nitrogênio líquido e posteriormente a -80 °C.

A análise quantitativa da expressão gênica foi realizada através da técnica de PCR em tempo real utilizando o sistema Biorad CFX 96. A análise bioquímica que avalia a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) foi mensurada em resposta a quantidade de peróxido de hidrogênio pelo método de AEBI (1984). Os valores da enzima catalase foram corrigidos pelo valor da proteína de cada amostra (U catalase/mg proteína).

A significância estatística foi considerada quando os resultados apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ($p < 0,05$). Para comparação dos grupos foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA) *One-way*, respeitando-se as hipóteses de normalidade de distribuição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados encontrados demonstram um aumento significativo nos níveis de mRNA da CAT em 6h ($p < 0,05$), que seguiu aumentando significativamente em 12h ($p < 0,05$), com posteriores decréscimos significativos em 24h ($p < 0,05$) e 48h após o exercício ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo controle (Fig. 2a). Quanto a atividade da enzima semelhantemente houve um aumento significativo em 6h ($p < 0,05$) após a sessão exaustiva de exercício permanecendo aumentado significativamente após 12h ($p < 0,01$). A partir de 24h observou-se um decréscimo significativo na atividade enzimática ($p < 0,05$), retornando aos seus níveis basais em 48h após o exercício ($p < 0,05$) (Fig. 2b). Todos os grupos foram comparados com o controle.

No estudo de Schneider et al., (2009) foi demonstrado uma redução na atividade da CAT em ratos treinados por natação. Já nos resultados encontrados por Gul, M et al (2006) houve diferença significativa na atividade enzimática imediatamente após o exercício exaustivo no músculo cardíaco de ratos, corroborando com os dados encontrados no presente estudo. Acredita-se que as diferentes respostas da enzima catalase ao exercício está relacionada aos diferentes tipos de protocolo de exercício tais como: natação, corrida em esteira ou em roda de atividade espontânea, exercício crônico ou exaustivo e ao tipo de tecido analisado.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que logo nas primeiras horas após o exercício já foi possível identificar uma resposta da expressão e da atividade da enzima

catalase, sugerindo que o impacto do exercício físico na atividade dessa enzima antioxidante detoxificadora de H₂O₂ parece ser maior no período de 6h a 12h após o exercício.

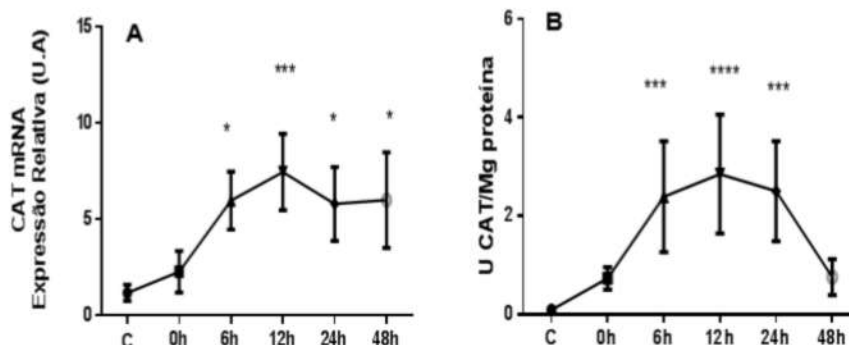


FIGURA 2 - Expressão gênica da catalase na porção vermelha do músculo gastrocnêmio (A) e a atividade enzimática da enzima catalase na porção vermelha do músculo gastrocnêmio (B). Os valores da expressão gênica e atividade enzimática representam a média \pm erro padrão e expressos em unidade de catalase por miligrama de proteína. Diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre os grupos são indicadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Met enzymol*, 105: 121-126, 1984.
- ARAÚJO, D.S.M.S.; ARAÚJO, C.G.S. Aptidão Física, Saúde e Qualidade de Vida Relacionada à Saúde em Adultos. *Rev. Bras. Med. Esporte*, Vol. 6, n.5, p.194-203, 2000.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R. BRESSAN, J. Estresse Oxidativo: Conceito Implicações e Fatores Modulatórios. *Rev. Nutr.*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. *Rev Nutr*, v. 12, n. 21, p. 123-130, 1999.
- GOODSELL, D. Catalase RCSB PDB. Molecule of the Month, 2004.
- GUL, M.; DEMIRCAN, B.; TAYSI, S.; OZTASAN, N.; GUMUSTEKIN, K.; SIKTAR, E.; POLAT, M.F.; AKAR, S.; AKCAY, F.; DANE S. Effects of

- endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2006 Feb;143(2):239-45. Epub 2006 Jan 19.
- HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, 4th edn, 2007.
- POWERS SK, JACKSON MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev*, v. 88, p. 1243–1276, 2008.
- SCHNEIDER, C.D.; SILVEIRA, M.M.; MOREIRA, J.C.F.; BELLO-KLEIN, A.; OLIVEIRA, A.R. Efeito do Exercício de Ultrarresistência sobre os Parâmetros de Estresse Oxidativo. *Rev. Bras. Med. Esporte*, v. 15, n. 2, p. 89-92, 2009.
- WHO. World Health Organization. Global Recommendations on Physical Activity for Health. Geneva; 2014.