

EFEITO DO RESVERATROL NA EXPRESSÃO GÊNICA DOS ATROGENES E GENES AUTOFÁGICOS EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS SÉPTICOS

Rennan Antônio Barreto de Abreu¹; Eduardo Carvalho Lira²

¹Estudante do Curso de Odontologia – CCS – UFPE. E-mail: estudante@provedor, ²Docente/pesquisador do Depto de Fisiologia e Farmacologia – CCB – UFPE. E-mail: eduardo.clira2@ufpe.br

Sumário: O uso de antioxidantes naturais como o resveratrol pode representar uma estratégia terapêutica no combate à atrofia muscular. O objetivo foi avaliar o efeito do resveratrol (10^{-3} M) na expressão dos atrogenes: atrogina-1 e MuRF1 (E_3 ligases) e genes autofágicos (LC3) em músculos esquelético de ratos sépticos. A sepse foi induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP) e a expressão dos atrogenes determinada pelo PCR em tempo real. Após 3 horas de infecção, a sepse elevou a expressão gênica das E_3 -ligases atrogina-1 e MuRF1 (~15X) e do gene autofágico, LC3 (~5X). De modo contraditório, o resveratrol estimulou ainda mais a hiperexpressão de MuRF1 em músculos de animais CLP (2X), sem modular atrogina-1 e LC3. Estes resultados mostraram que o resveratrol modula negativamente a expressão de E_3 -ligases agudamente na sepse.

Palavras-chave: antioxidantes naturais; atrofia muscular; músculos esquelético de ratos sépticos; PCR.

INTRODUÇÃO

O músculo esquelético, além de suas funções clássicas de geração de força e locomoção, representa de 45 a 50% da massa corporal, contem 90% do pool de aminoácidos livres do corpo [1]. A massa muscular é determinada por um ciclo dinâmico que envolve dois processos metabólicos antagônicos: a síntese e a degradação de proteínas. Alterações nestes processos podem determinar ganho (hipertrofia) ou a perda (atrofia) de massa. Atualmente, sabe-se que o aumento da proteólise é o principal mecanismo fisiopatológico responsável pela perda de massa muscular em diferentes situações patológicas e, que ainda não existem alternativas terapêuticas eficientes para preveni-la. No músculo esquelético existem pelo menos 3 sistemas proteolíticos: (a) lisossomal, constituído pelas cathepsinas; (b) dependente de cálcio (Ca^{2+}), um sistema que além de suas proteases conhecidas, as calpaínas, apresentam um inibidor endógeno denominado calpastatina; e (c) sistema Ubiquitina-Proteassoma (UbP). A atividade destes sistemas é fundamental para manutenção da homeostasia, uma vez que estão envolvidos na reciclagem de proteínas extracelulares e receptores de membrana, no ciclo celular, crescimento e diferenciação celular e na própria resposta imunológica [2,3] A hiperatividade destes sistemas proteolíticos é o principal mecanismo fisiopatológico responsável pela perda de massa muscular que ocorre em diferentes situações catabólicas como sepse, câncer, desnervação motora, insuficiência renal crônica, diabetes *mellitus*, etc. Por esta razão, o desenvolvimento de novas drogas que possam atenuar a hiperatividade desses sistemas pode representar uma alternativa terapêutica eficiente no combate à atrofia muscular. A instalação da atrofia muscular envolve um plano atrofico, isto é, um conjunto de ações que envolvem não apenas o aumento da atividade dos sistemas proteolíticos, mas também o aumento e/ou a redução da expressão de genes denominados coletivamente de atrogenes

[4]. Em 2001, foi demonstrado o aumento da expressão dos genes das E₃ ligases atrogina-1/MAFBx (*Muscle Atrophy Fbox*) e MuRF1 (*Muscle Ring Finger 1*) em diferentes situações atroficas como o jejum, a uremia, o câncer, a denervação, o diabetes *mellitus* e a sepse [4,5,6], o que os torna marcadores de atrofia. Deste grupo fazem parte não apenas as E₃ ligases, mas genes relacionados à autofagia e a própria atividade lisossomal (cathepsina L), cuja expressão pode ser alterada em diferentes situações patológicas [4,5,7]. Diferentes fatores estão envolvidos na hiperexpressão dos atrogenes e na atividade dos sistemas proteolíticos como os glicocorticoides, as espécies reativas de oxigênio (ROS), assim como as citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) [8, 9,10]. É bem compreendido que o estado redox da célula é finamente regulado pelo balanço entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, de modo que o desequilíbrio destes gera o estresse oxidativo [11]. Em células de mamíferos, a geração de espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido (O₂⁻), radical hidroxila (•OH) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) são contrabalanceados por sistemas antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPX) e não enzimáticos como as vitaminas, glutathione e outros tióis [11]. De modo que a manutenção, assim como variações estreitas do estado redox, é fundamental para homeostasia celular. Nesta perspectiva o estresse oxidativo e as situações inflamatórias são mecanismos importantes para o desenvolvimento da atrofia muscular, fato que tem renovado na literatura o interesse no efeito de antioxidantes na musculatura esquelética. Dentre as condições clinicamente importantes, a sepse se destaca como uma grande preocupação dada a alta prevalência e mortalidade. Conceitualmente está relacionada à intensa resposta inflamatória do hospedeiro em resposta a colonização de microorganismos em tecidos estéreis, acompanhada de uma profunda desestabilização hemodinâmica, alterações metabólicas, estado inflamatório grave, estresse oxidativo [12]. No Brasil, a sepse também representa um grande desafio, com mortalidade de 47% em pacientes de UTI, elevando-se a 65% no choque séptico [13]. Uma das principais alterações metabólicas observadas no paciente séptico é a resposta catabólicas na musculatura esquelética, principalmente devido ao aumento da degradação das proteínas miofibrilares [14]. O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um antioxidante natural pertencente a classe das fitoalexinas e produzido a partir do metabolismo secundário de mais de 70 espécies de plantas [15]. É produzido como os isômeros *trans*- e *cis*-resveratrol, sendo a isoforma *trans* a de maior ocorrência e mais estável. Encontrado nas uvas, com sua concentração média e de 50 a 400 μ g/g em extratos frescos de folhas. A suplementação dietética com resveratrol melhora o metabolismo lipídico e glicídico em músculo esquelético *in vivo* e *in vitro*, assim como atenua a atrofia muscular em animais com tumor MAC16 [16]. Deste modo, este trabalho avaliou o efeito do resveratrol, um antioxidante natural, na expressão dos atrogenes em músculos de ratos normais e sépticos.

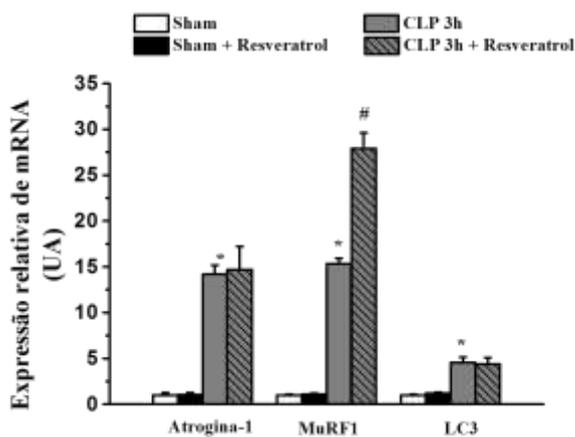
MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (\pm 80g) fornecidos pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo CEUA/UFPE (proc. n° 23076.01234/2012-79). Os ratos foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg, i.p.). Em seguida, foi realizada uma laparotomia exploratória para exteriorização e posterior punção do ceco, preservando-se o leito vascular local. O ceco foi perfurado 2 vezes com uma agulha de calibre 16G próximo à ligadura. Ao término da cirurgia, os animais receberam 10mL/Kg de salina 0,9% por via subcutânea a fim de se evitar a hipovolemia e choque séptico. Os animais controle foram submetidos à cirurgia fictícia (grupo sham). Após 3 horas de sepse, os animais foram eutanasiados por

descolamento cervical e o músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos sham e sépticos (CLP) foram rapidamente retirados, fixados pelos tendões a suporte próprio para a manutenção do comprimento de repouso e incubados em tampão Krebs Ringer Bicarbonato na presença de glicose (5mM) e incubados na presença do resveratrol (10^{-3} M). Após a incubação, os músculos EDL foram armazenados a -80°C . Em seguida o RNA total foi extraído individualmente utilizando TRIZOL (Invitrogen[®], Carlsbad, CA) e os níveis de mRNA de atrogina-1, MuRF1 e LC3 foram determinados usando PCR em tempo real. A PCR em tempo real foi realizada utilizando um sistema de detecção de sequência VABI7000 (Applied Biosystems[®], Foster City, CA), um SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step RT-qPCR Kit com ROX (Invitrogen[®], Carlsbad, CA), e primers para rato de atrogina-1, MuRF1, LC3 e ciclofilina. Os resultados foram expressos como médias \pm EP (erro padrão). Para a análise e interpretação dos dados foi realizado o teste “t” de Student para comparação entre médias, seguido de pós-teste de Holm-Sidak para comparação entre grupos. O nível de significância adotado foi de 5% ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

O desenvolvimento da atrofia muscular envolve não apenas o aumento da atividade dos sistemas proteolíticos, mas também o aumento da expressão de um conjunto de genes denominados atrogene, dentre eles: atrogina-1, MuRF1 e LC3, os quais são marcadores da atrofia muscular e diretamente relacionados a atividade dos sistemas proteassoma e ubiquitina-lisossomal [4,5,6]. Como observado na figura 2, a CLP elevou a expressão após 3 horas gênica das E3-MuRF1 (~15X) e do gene autofágico, LC3 (~5X). De modo contraditório, o resveratrol estimulou ainda mais a hiperexpressão de MuRF1 em músculos de animais CLP (2X), sem modular atrogina-1 e LC3 (fig. 1).



proteolíticos, mas também o aumento da expressão de um conjunto de genes atrogene, dentre MuRF1 e LC3, os marcadores da atrofia muscular e diretamente relacionados a atividade dos sistemas proteassoma e ubiquitina-lisossomal [4,5,6]. Como observado na figura 2, a CLP elevou a expressão após 3 horas gênica das E3-

Figura 01 – Efeito do resveratrol (10^{-3} M) na expressão gênica da atrogina1, MuRF1 e LC3 em músculos EDL de animais sham e sépticos.

DISCUSSÃO

A sepse induzida pelo modelo de ligadura e punção do ceco é considerado o modelo que melhor reproduz experimentalmente a condição clínica em animais [17,18]. É bem demonstrado o intenso catabolismo proteico em fases iniciais da sepse como alternativa para o fornecimento de aminoácidos para funções metabólicas em órgãos vitais [19]. Entretanto, a perda de proteínas musculares, sobretudo miofibrilares, está diretamente relacionada às principais comorbidades deste quadro, dentre elas o maior risco de tromboembolias, atrofia muscular e perda da capacidade respiratória [19]. Lira *et al.* [20] demonstraram o aumento do catabolismo proteico após 3 horas de infecção, fase que precede a instalação da atrofia muscular na sepse. Nesta perspectiva, estratégias terapêuticas que possam atenuar a perda excessiva de proteínas musculares, assim como prevenir a instalação da atrofia muscular em condições debilitantes se tornam

extremamente interessantes como alternativa de redução dos impactos negativos do balanço nitrogenado em pacientes. O desenvolvimento da atrofia muscular representa não somente a hiperatividade dos sistemas proteolíticos, mas a modulação de genes coletivamente denominados atrogenes que incluem as E3-ligases e genes autofágicos [4]. Frost *et al.* [10] demonstraram a hiperexpressão de atrogina-1 e MuRF1 em músculos glicolíticos de ratos submetidos à ligadura e punção do ceco. De modo semelhante, Alamdari *et al.* [21] evidenciaram que o resveratrol foi eficiente ao atenuar a expressão gênica destas E₃ ligases induzida por dexametasona por um mecanismo dependente da SIRT1. Contraditoriamente, em nosso estudo, o resveratrol não atenuou a hiperexpressão destas E₃ ligases e dos genes autofágicos (LC3) induzida pela sepse, ao contrário elevou ainda mais a expressão da MuRF1 (fig. 1). Além disso, esta fitoalexina foi capaz de prevenir a atrofia muscular induzida pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em células C2C12 por um mecanismo que envolve a via Akt/mTOR/Foxo1 [22]. Esta aparente contradição pode ser atribuída ao modelo de estudo avaliado, sobretudo porque os autores anteriormente citados utilizaram cultura de células e neste trabalho utilizamos o tecido muscular. Novos experimentos são necessários para confirmação destes resultados.

CONCLUSÕES

A CLP após 3 horas de infecção induziu um aumento na expressão dos genes atrofícos, entretanto, o resveratrol não a inibiu. Ao contrário, esta fitoalexina estimulou ainda mais a expressão da MuRF1, uma importante E₃-ligase envolvida com o processo atrofíco. Nossos resultados mostram claramente que o uso do resveratrol pode não representar uma alternativa terapêutica em fases tão agudas de infecção.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Universal 485835/2011-8) e pela Universidade Federal de Pernambuco. Também agradecemos a colaboração dos Profs. Isis do Carmo Kettelhut e Luiz Carlos Carvalho Navegantes (FMPR/USP) e Dayane A. Gomes (DFP/UFPE).

REFERÊNCIAS

1. GUTIERREZ, A.; ANDERSTAM, B.; ALVESTRAND, A. 1999. Amino acid concentration in the interstitium of human skeletal muscle: a microdialysis study. **Eur J Clin Invest**, 29:947-952.
2. LECKER, S.H.; SOLOMON, V.; MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. 1999. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **J Nutr**, 129:227S-237S.
3. GOLL, D.E.; NETI, G.; MARES, S.W.; THOMPSON, V.F. 2008. Myofibrillar protein turnover: The proteasome and the calpains. **J Anim Sci**, 86(14):E19-E35.
4. LECKER, S.H.; JAGOE, R.T.; GILBERT, A.; GOMES, M.; BARACOS, V.; BAILEU, J.; PRICE, S.R.; MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. 2004. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **FASEB J**, 18: 39-51.
5. BODINE, S.C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V.K.; NUNEZ, L.; CLARKE, B.A.; POUYMIROU, W.T.; PANARO, F.J.; NA, E.; DHARMARAJAN PAN, Z.Q.; VALENZUELA, D.M.; DECHIARA, T.M.; STITT, T.N.; YANCOPOULOS. G.D.; GLASS, D.J. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, 294(5547):1704-1708.

6. GOMES, M.D.; LECKER, S.H.; JAGOE, R.T.; NAVON, A.; GOLDBERG, A.L. 2001. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98:14440-14445.
7. DEVAL, C.; MORDIER, S.; OBLED, C.; BECHET, D.; COMBARET, L.; ATTAIX, D. 2001. Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. **Biochem J**, 360: 143-150.
8. LI, Y.P.; CHEN, Y.; LI, A.S.; REID, M.B. 2003. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. **Am J Physiol Cell Physiol**, 285: C806-C812.
9. CAI, D.; FRANTZ, J.D.; TAWA, N.E.JR.; MELENDEZ, P.A.; OH, B.C.; LIDOV, H.G.; HASSELGREN, P.O.; FRONTERA, W.R.; LEE, J.; GLASS, D.J.; SHOELSON, S.E. 2004. IKK β /NF- κ B activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell**, 119(2):285- 298.
10. FROST, R.A.; NYSTROM, G.J.; JEFFERSON, L.S.; LANG, C.H. 2007. Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 292: E501-E512.
11. BONETTO, A.; PENNA, F.; MUSCARITOLI, M.; MINERO, V.G.; FANELLI, F.R.; BACCINO, F.M.; COSTELLI, P. 2009. Are antioxidants useful for treating skeletal muscle atrophy? **Free Radic Biol Med**, 47: 906–916.
12. ANGUS, D.C.; WAX, R.S. 2001. Epidemiology of sepsis: an update. **Crit Care Med**, 29: 109-116.
13. JÚNIOR, J.A.L.S.; DAVID, C.M.; HATUM, R.; SOUZA, P.C.S.P.; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C.T.S.; FRIEDMAN, G.; SILVA, O.B.; DIAS, M.A.; KOTERBA, E.; DIAS, F.S.; PIRAS, C.; LUIZ, R.R. 2006. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. **Rev Bras Terap Intens**, 18: 9-17.
14. FISCHER, D.R.; SUN, X.; WILLIAMS, A.B.; GANG, G.; PRITTS, T.A.; JAMES, J.H.; MOLLOY, M.; FISCHER, J.E.; PAUL, R.J.; HASSELGREN, P.O. 2001. Dantrolene reduces serum TNF α and corticosterone levels and muscle calcium, calpain gene expression and protein breakdown in septic rats. **Shock**, 15: 200-207.
15. CHERNIACK, E.P. 2010. The Potential Influence of Plant Polyphenols on the Aging Process. **Forsch Komplementmed**, 17:181-187.
16. WYKE, S.M.; RUSSELL, S.T.; TISDALE, M.J. 2004. Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF- κ B activation. **Br J Cancer**, 91(9):1742-1750.
17. WICHTERMAN, K.A.; BAUE, A.E.; CHAUDRY, I.H. 1980. Sepsis and septic shock – a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res**, 29: 189-201.
18. PEDERSEN, P.V.; WARNER, B.W.; BJORNSON, H.S.; HIYAMA, D.T.; LI, S.; RIGEL, D.F.; HASSELGREN, P.O.; FISCHER, J.E. 1989. Hemodynamic and metabolic alterations during experimental sepsis in young and adult rats. **Surg. Gynecol Obstet**, 168: 148-156.
19. HASSELGREN, P.O.; MENCONI, M.J.; FAREED, M.U.; YANG, H.; WEI, W.; EVENSON, A. 2005. Novel aspects on the regulation of muscle wasting in sepsis. **Int J Biochem Cell Biol**, 37: 2156-2168.

20. LIRA, E.C.; GRACA, F.A.; GONCALVES, D.A.P.; ZANON, N.M.; BAVIERA, A.M., STRINDBERG, L.; LONNROTH, P.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I.C.; NAVEGANTES, L.C.C. 2007. Cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase inhibitors reduce skeletal muscle protein catabolism in septic rats. **Shock**, 27(6): 687-694.
21. ALAMDARI, N.; AVERSA, Z.; CASTILLERO, E.; HASSELGREN, P. O. 2013. Acetylation and deacetylation—novel factors in muscle wasting. **Metabolism**, 62(1): 1-11.
22. WANG, D.T.; YIN, Y.; YANG, Y.J.; LV, P.J.; SHI, Y.; LU, L.; WEI, L.B. 2014. Resveratrol prevents TNF- α -induced muscle atrophy via regulation of Akt/mTOR/FoxO1 signaling in C2C12 myotubes. **Int Immunopharmacol**, 19(2): 206-213.