

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA MITOCONDRIAL DE APOPTOSE NO MIOCÁRDIO DE RATOS SUBMETIDOS A ALIMENTAÇÃO INTERMITENTE E EXERCÍCIO FÍSICO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE

Marianna Rabelo de Carvalho^{1*}, Maria Lua M. Mendonça¹, Jéssica Maria L. Oliveira², Luana Urbano Pagan³, Marina Politi Okoshi⁴, Silvio Assis de Oliveira Junior⁵, Paula Felipe Martinez⁶

1. Aluna do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste (UFMS)
2. Aluna de Iniciação Científica do Curso de Fisioterapia - Instituto Integrado de Saúde (INISA) – UFMS
3. Aluna de Pós-doutorado - Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP
4. Professor Adjunto da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP
5. Professor do Curso de Fisioterapia - Instituto Integrado de Saúde (INISA) – UFMS
6. Professor do Curso de Fisioterapia - Instituto Integrado de Saúde (INISA) – UFMS/Orientador

Resumo

INTRODUÇÃO: Há evidências que tanto o exercício intervalado de alta intensidade quanto a alimentação intermitente promovem cardioproteção por mecanismos anti-apoptóticos. **OBJETIVO:** Avaliar a influência da associação entre a alimentação intermitente e o exercício físico intervalado sobre a via mitocondrial de apoptose no miocárdio de ratos. **MÉTODOS:** Ratos Wistar foram distribuídos em quatro grupos: Os grupos C e EX foram tratados diariamente com ração *ad libitum*; Já os animais dos grupos AI e EAI receberam a mesma ração padrão, administrada *ad libitum*, alternada com dias de jejum total/24 horas. Os animais EX e EAI realizaram protocolo de exercício físico intervalado de alta intensidade na esteira durante 12 semanas. Ao final do protocolo, foi analisada expressão de proteínas relacionadas à via mitocondrial de apoptose por Western Blot. **CONCLUSÃO:** A alimentação intermitente, de forma isolada e quando associada ao exercício, reduz a apoptose pela via mitocondrial no miocárdio.

Autorização legal: O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (protocolo nº 778/2016).

Palavras-chave: morte celular; coração; restrição calórica

Introdução

Estudos apontam que tanto a alimentação intermitente (AI) quanto o exercício físico podem reduzir o processo de apoptose no miocárdio (KATARE *et al.*, 2009; WAN *et al.*, 2010; WENG *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2015; GAHRAMANI *et al.*, 2016). A AI, uma estratégia nutricional em que a dieta é consumida em ciclos de jejum e alimentação em dias alternados, tem sido relacionada a melhora da resposta inflamatória e redução da apoptose no miocárdio em modelos de agressão cardíaca (AHMET *et al.*, 2005; KATARE *et al.*, 2009).

Dentre as diversas modalidades de exercício, há crescente interesse pelo exercício intervalado de alta intensidade (HIIT). Caracterizado por breves e intermitentes explosões de atividade vigorosa, cerca de 90% do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) ou da frequência cardíaca máxima (FC_{max}), alternados com períodos de recuperação passiva ou ativa (BILLAT, 2001), o HIIT tem se destacado por ser uma alternativa tempo-eficiente em relação ao exercício moderado contínuo para induzir adaptações cardíacas (SWAIN *et al.*, 2006). Em modelos de agressão cardíaca, protocolo de HIIT realizado por oito semanas melhorou a produção de ATP, reduziu o estresse oxidativo e a expressão de proteínas pró-apoptóticas no coração de ratos infartados (LU *et al.*, 2015). Gahramani *et al.* (2016) observaram que ratos com infarto do miocárdio submetidos a exercício intervalado de alta intensidade durante seis semanas apresentaram menor expressão da proteína pró-apoptótica Caspase-9 em relação aos ratos infartados sedentários e maior expressão quando comparado aos ratos infartados que realizaram exercício moderado contínuo, reforçando o papel da intensidade do exercício na modulação das alterações cardíacas.

Embora existam evidências que a AI e o HIIT possam reduzir apoptose, os mecanismos pelos quais eles atuam ainda não estão totalmente estabelecidos. Além disso, não foram encontrados estudos avaliando as vias moleculares de apoptose no miocárdio de ratos saudáveis submetidos a associação dessas intervenções. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar a influência da associação entre a alimentação intermitente e o exercício físico intervalado de alta intensidade sobre a via mitocondrial de apoptose no miocárdio de ratos.

Metodologia

Animais e protocolo experimental

Foram utilizados 34 ratos Wistar machos com 60 dias de idade, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas alojados sob temperatura e umidade controladas e iluminação com ciclos de 12 horas. Os animais foram distribuídos em quatro grupos: Controle (C), Alimentação Intermitente (AI), Exercício Físico Intervalado (EX) e Exercício Físico Intervalado e Alimentação Intermitente (EAI). Todos os grupos experimentais receberam dieta normocalórica

comercial padrão para roedores. Os grupos C e EX foram tratados diariamente com ração *ad libitum*, já os animais dos grupos AI e EAI receberam a mesma ração padrão, administrada *ad libitum* em dias alternados com dias de jejum total. Os animais dos grupos EX e EAI foram submetidos à um protocolo de corrida em esteira rolante, elaborado com base em estudo anterior (MOREIRA *et al.*, 2013). O período experimental totalizou 12 semanas. Todos os procedimentos experimentais foram realizados conforme o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, publicado pelo “*U. S. National Institutes of Health*”.

Teste de esforço e protocolo de Exercício Aeróbico Intervalado

Para verificar o comportamento da capacidade funcional ao esforço, foi realizado um teste de esforço máximo, utilizando-se protocolo incremental para ratos com o propósito de determinar a velocidade máxima alcançada. Logo após, os animais foram submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbio intervalado de corrida em esteira rolante com intensidades alternadas. Foram realizadas cinco sessões semanais de exercício físico, com duração de 49 minutos cada. Cada seção foi dividida em 3 minutos a 60% da velocidade máxima alcançada no teste de esforço, seguidos por 4 minutos de corrida a 85% da velocidade máxima e este ciclo foi repetido por sete vezes. O protocolo foi realizado a 15° de inclinação da esteira rolante. Um aquecimento prévio a cada sessão aconteceu na intensidade de 40% da velocidade máxima alcançada, por 10 min (MOREIRA *et al.*, 2013).

Eutanásia dos animais e remoção dos tecidos

Ao final do período experimental, os animais foram mantidos em jejum e submetidos à anestesia intraperitoneal com tiopental (80mg/kg) e eutanasiados por decapitação. Após coleta do sangue, o coração foi retirado por toracotomia mediana. Amostras de VE foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a -80 °C (OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2014).

Quantificação das proteínas relacionadas à via mitocondrial de apoptose por Western blot

A expressão das proteínas relacionadas à via da apoptose [caspase-3, caspase-9, citocromo c, B-cell leucemia/lymphoma-2 (Bcl-2) e Bcl-2 associado a proteína X (Bax)] foi analisada por meio da técnica de Western Blot (MARTINEZ *et al.*, 2016).

Análise estatística

Os dados foram apresentados em medidas descritivas de posição e variabilidade. Para comparação entre os grupos, foi realizada análise de variância de duas vias (ANOVA) complementada com teste Tukey. O nível de significância considerado foi de 5%.

Resultados e Discussão

Na tabela 1 está descrito os resultados da expressão das proteínas relacionadas à via mitocondrial de apoptose. A expressão da proteína BCL-2 foi maior nos grupos AI e EAI quando comparados aos grupos C e EX respectivamente. A expressão de BAX foi menor no AI em relação ao grupo C. A razão entre as expressões da proteína BAX e BCL-2 foi menor nos grupos AI e EAI quando comparados aos grupos C e EX. O Citocromo C foi menor nos grupos AI e EX quando comparados ao grupo C. Já a expressão proteica de Caspase-3 foi maior no EX que no grupo C.

Tabela 1. Expressão das proteínas relacionadas à via mitocondrial de apoptose

Proteínas	Grupos			
	C (n=8)	AI (n=9)	EX (n=8)	EAI (n=9)
BCL-2/GAPDH	0,93±0,28	1,7±0,38*	0,84±0,48	1,4±0,16#
BAX/GAPDH	0,53± 0,31	0,29±0,15*	0,41± 0,16	0,35± 0,08
Razão BAX / BCL-2	0,62±0,40	0,18±0,10	0,65±0,42	0,25±0,06
Citocromo C/GAPDH	2,1±0,75	1,3±0,27*	1,10±0,26*	0,91±0,40
Caspase-3/GAPDH	0,64±0,27	0,70±0,37	1,0±0,29*	0,77±0,37

C: Controle; AI: Alimentação Intermitente; EX: Exercício; EAI: Exercício Alimentação Intermitente. Valores em média ± desvio padrão. ANOVA de duas vias com post hoc de Tukey. *p<0,05 vs. C; # p<0,05 vs. Ex.

No presente trabalho, os grupos dos animais submetidos à alimentação intermitente obtiveram menor expressão da proteína pró-apoptótica Citocromo C e BAX, além de maior expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 quando submetidos somente à alimentação intermitente e à associação da alimentação intermitente e exercício. É bem discutido na literatura, que na presença de estímulos nocivos, a membrana da mitocôndria sofre

alteração da sua permeabilidade e como consequência, possibilita a entrada da proteína BAX, resultando na liberação do Citocromo C para o citosol. O Citocromo C liberado, facilita a formação do complexo apoptossômico e consequente ativação da caspase-3. Por outro lado, esses eventos são impedidos pela ação da proteína BCL-2 que mantém a integridade da membrana externa da mitocôndria impedindo a entrada da proteína BAX para o interior da célula (GRIVICICH *et al.*, 2007). Alguns autores aventam que, por ser um estresse leve e repetitivo, a alimentação intermitente induz a expressão de genes que aumentam a capacidade das células para lidar com estresses mais graves, ativando vias de sinalização que protegem contra o aumento da permeabilidade mitocondrial (YU *et al.*, 2001), reduzindo a entrada de genes pró-apoptóticos e aumentando a capacidade anti-apoptótica (MATTSON *et al.*, 2008; WAN *et al.*, 2010; MATTSON *et al.*, 2017).

No entanto, contrário aos efeitos anti-apoptóticos da alimentação intermitente no presente estudo, o exercício intervalado de alta intensidade induziu o aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Caspase-3 no coração de ratos saudáveis. O aumento da apoptose é bastante associado a condições patológicas que levam a deterioração progressiva do coração (BURCHFIELD *et al.*, 2013; AZEVEDO *et al.*, 2015). Na literatura, autores sugerem que a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) induzida pelo exercício exaustivo e de alta intensidade contribui para aumento da apoptose e tem impacto negativo na resposta imune do organismo (MOOREN *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2008; TANIMURA *et al.*, 2008). Semelhante aos nossos achados, Huang *et al.* (2009) observaram que, após realizar protocolo de exercício exaustivo por 12 semanas, ratos saudáveis apresentaram alteração mitocondrial e aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas Citocromo C e Caspase-3 e da razão BAX/BCL-2.

Conclusões

A alimentação intermitente, de forma isolada e quando associada ao exercício intervalado de alta intensidade, reduz a apoptose pela via mitocondrial no miocárdio de ratos.

Referências bibliográficas

- AHMET, I.; WAN, R.; MATTSON, M. P.; LAKATTA, E. G.; TALAN, M. Cardioprotection by Intermittent Fasting in Rats. **Circulation**. v. 112, n. 20, p.3115-3121. 2005.
- AZEVEDO, P. S.; POLEGATO, B. F.; MINICUCCI, M. F.; PAIVA, S. A. R.; ZORNOFF, L. A. M. Remodelação Cardíaca: Conceitos, Impacto Clínico, Mecanismos Fisiopatológicos e Tratamento Farmacológico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v.106, p. 62-69, 2015.
- BILLAT, L. V. Interval training for performance: a scientific and empirical practice. Special recommendations for middle-and long-distance running. Part I: aerobic interval training. **Sports Medicine**.v.31, n.1, p.13-31, 2001.
- BURCHFIELD, J. S.; XIE, M.; HILL, J. A. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. **Circulation**. v. 128, p.388-400, 2013.
- GAHRAMANI, M.; AZARBAYJANI, A. M.; PEERI, M.; RAOUFI, A. Interval Training Intensity and the Expression of Caspase-9 in Obese Rats with Myocardial Infarction. **Iranian Journal of Diabetes & Obesity**, v. 8, n. 3, p. 115-120, 2016.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343. 2007.
- HUANG, C. C.; TSAI, S. C.; LIN, W. T. Potential ergogenic effects of L-arginine against oxidative and inflammatory stress induced by acute exercise in aging rats. **Experimental Gerontology**. v. 43, p.571-577, 2008.
- HUANG, C. C.; LIN, T. J.; CHEN, C. C.; LIN, W. T. Endurance training accelerates exhaustive exercise-induced mitochondrial DNA deletion and apoptosis of left ventricle myocardium in rats. **European Journal of Applied Physiology**. v. 107, p.697-706, 2009.
- KATARE, R. G.; KAKINUMA, Y.; ARIKAWA, M.; YAMASAKI, F.; SATO, T. Chronic intermittent fasting improves the survival following large myocardial ischemia by activation of BDNF/VEGF/PI3K signaling pathway. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 46, p. 405-412, 2009.
- LU, K.; WANG, L.; YANG, Y.; HU, D.; DING, R. Effects of high-intensity interval versus continuous moderate-intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. **Molecular Medicine Reports**. v. 12, p. 2374-2382, 2015.
- MARTINEZ, P. F.; BONOMO, C.; GUIZONI, D. M.; JUNIOR, S. A.; DAMATTO, R. L.; CEZAR, M. D.; LIMA, A. R.; PAGAN, L. U.; SEIVA, F. R.; BUENO, R. T.; FERNANDES, D. C.; LAURINDO, F. R.; ZORNOFF, L. A.; OKOSHI, K.; OKOSHI, M. P. Modulation of MAPK and NF-954;B Signaling Pathways by Antioxidant Therapy in Skeletal Muscle of Heart Failure Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.39, n.1, p.371-384, 2016.

- MATTSON, M. P. Dietary factors, hormesis and health. **Ageing Research Reviews**. v. 7, p. 43-48. 2008.
- MATTSON, M. P.; LONGO, V. D.; HARVIE, M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. **Ageing Research Reviews**. v. 39, p. 46–58, 2017.
- MOOREN, F. C.; BLOMING, D.; LECHTERMANN, A.; LERCH, M. M.; VOLKER, K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. **Journal of Applied Physiology**. v.93, p. 147-153, 2002.
- OLIVEIRA JUNIOR, S. A.; MARTINEZ, P. F.; GUIZONI, D. M.; CAMPOS, D. H.; FERNANDES, T.; OLIVEIRA, E. M.; OKOSHI, M. P.; OKOSHI, K.; PADOVANI, C. R.; CICOGNA, A. C. AT1 receptor blockade attenuates insulin resistance and myocardial remodeling in rats with diet-induced obesity. **Plos One**.n.9, p.1-10, 2014.
- SWAIN, D. P.; FRANKLIN, B. A. Comparison of Cardioprotective Benefits of Vigorous Versus Moderate Intensity Aerobic Exercise.**The American Journal of Cardiology**. v. 97, p. 141-147, 2006.
- TANIMURA, Y.; SHIMIZU, K.; TANABE, K.; OTSUKI, T.; YAMAUCHI, R.; MATSUBARA, Y.; IEMITSU, M.; MAEDA, S.; AJISAKA, R. Exercise-induced oxidative DNA damage and lymphocytopenia in sedentary young males. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 40, p.1455-1462, 2008.
- WAN, R.; AHMET, I.; BROWN, M.; CHENG, A.; KAMIMURA, N.; TALAN M.; MATTSON, M. P. Cardioprotective Effect of Intermittent Fasting is Associated withan Elevation of Adiponectin Levels in Rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 21, p.413–417, 2010.
- WENG, T. P.; HUANG, S. C.; CHUANG, Y. F.; WANH, Y. F. Effects of Interval and Continuous Exercise Training on CD4 Lymphocyte Apoptotic and Autophagic Responses to Hypoxic Stress in Sedentary Men. **Plos One**. v. 8, e80248, 2013.
- YU, B. P.; CHUNG, H. Y. Stress resistance by caloric restriction for longevity. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 928, p. 39-47, 2001.