

ALTERAÇÕES RELACIONADAS À AUTOFAGIA MUSCULAR APÓS EXERCÍCIO EXAUSTIVO E TRAUMA CONTUSO

CHANGES RELATED TO MUSCLE AUTOPHAGY AFTER EXHAUSTIVE EXERCISE AND BLUNT TRAUMA

ARTIGO ORIGINAL
ORIGINAL ARTICLE
ARTÍCULO ORIGINAL

CAMBIOS RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA MUSCULAR TRAS EJERCICIO EXHAUSTIVO Y TRAUMATISMO CONTUSO

Tongbin Pan¹ 
(Profissional de Educação Física)
Jianjian Jiao¹ 
(Profissional de Educação Física)
Leilei Ye² 
(Profissional de Educação Física)
Xinwei Tong¹ 
(Profissional de Educação Física)
Qiuxin Wang¹
(Profissional de Educação Física)
Mengjin Ji¹ 
(Profissional de Educação Física)

1. Universidade de Yangzhou,
Faculdade de Educação Física,
Yangzhou, Jiangsu, China.
2. Nanjing Sport Institute,
Faculdade de Natação, Nanjing,
Jiangsu, China.

Correspondência:

Tongbin Pan
Universidade de YangZhou,
Faculdade de Educação Física,
Yangzhou, Jiangsu, China. 225009.
panlichina@sina.com

RESUMO

Objetivo: Estudar as alterações temporais dos fatores relacionados à autofagia no músculo esquelético de ratos após exercício exaustivo e trauma contuso. **Métodos:** Quarenta e dois ratos machos SD foram divididos em 7 grupos com 6 ratos em cada grupo: Grupo de controle silencioso (C), imediatamente após o exercício exaustivo (E0), 24 horas após o exercício exaustivo (E24), 48 horas após o exercício exaustivo (E48), imediatamente após o trauma contuso (D0), 24 horas após o trauma contuso (D24), 48 horas após o trauma contuso (D48). Todos os grupos de ratos foram mortos e rotulados, respectivamente, em diferentes momentos especificados acima, e o músculo gastrocnêmio direito foi retirado, dividido em duas partes, uma para mRNAs de Lamp-2, BNIP3 e NIX por PCR quantitativo fluorescente em tempo real, e a outra para a proteína p62 por imunotransferência. **Resultados:** (1) Em comparação com o grupo C, os níveis de mRNA de p62, Lamp-2 e NIX no grupo E48 aumentaram significativamente após o exercício exaustivo ($P < 0,05$), sugerindo que a autofagia aumentou em 48 horas após o exercício exaustivo. (2) Em comparação com o grupo C, os níveis de mRNA de p62mRNA e Lamp-2 foram significativamente aumentados imediatamente após o trauma contuso ($P < 0,05$) e diminuíram significativamente em 48 horas após o trauma contuso ($P < 0,05$), sugerindo que a atividade de autofagia foi aumentada imediatamente após o trauma contuso e diminuiu em 48 horas após a lesão. **Conclusão:** Houve, via de regra, diferenças em cada fase de recuperação entre os modelos de trauma contuso e de exercício exaustivo, sendo que os fatores de autofagia basal e os fatores de autofagia mitocondrial também foram inconsistentes. Os fatores de autofagia basal p62 e Lamp-2 aumentaram significativamente 48 horas após o exercício excêntrico exaustivo e imediatamente após o trauma contuso. O fator de autofagia mitocondrial BNIP3 não aumentou após o exercício exaustivo e o trauma contuso, mas o NIX aumentou somente após o exercício exaustivo. Seu mecanismo molecular precisa ser investigado com mais detalhes. **Nível de Evidência III; Estudos Terapêuticos que Investigam os Resultados do Tratamento.**

Descritores: Proteínas Relacionadas à Autofagia; Músculo Esquelético; Ferimentos não Penetrantes; Fadiga Muscular.

ABSTRACT

Objective: To study the temporal changes of autophagy related factors in skeletal muscle of rats after exhaustive exercise and blunt trauma. **Methods:** Forty-two male SD rats were divided into 7 groups with 6 rats in each group: Quiet control group (C), immediately after exhaustive exercise (E0), 24 hours after exhaustive exercise (E24), 48 hours after exhaustive exercise (E48), immediately after blunt trauma (D0), 24 hours after blunt trauma (D24), 48 hours after blunt trauma (D48). All groups of rats were killed and sampled respectively at different time points specified above, and the right gastrocnemius muscle was taken, which was divided into two parts, one for mRNAs of Lamp-2, BNIP3 and NIX by real-time fluorescent quantitative PCR, and the other for p62 protein by Western blotting. **Results:** (1) Compared with group C, mRNA levels of p62, Lamp-2 and NIX in group E48 were significantly increased after exhaustive exercise ($P < 0.05$), suggesting that autophagy increased in 48h after exhaustive exercise. (2) Compared with group C, p62mRNA and Lamp-2 mRNA levels were significantly increased immediately after blunt trauma ($P < 0.05$) and decreased significantly in 48h after blunt trauma ($P < 0.05$), suggesting that autophagy activity was enhanced immediately after blunt trauma and decreased in 48h after injury. **Conclusions:** Generally, there were differences at each recovery phase between blunt trauma and exhausted exercise models, and the basal autophagy factors and mitochondrial autophagy factors were also inconsistent. Basal autophagy factors p62 and Lamp-2 increased significantly 48 hours after eccentric exhaustive exercise and immediately after blunt trauma. Mitochondrial autophagy factor BNIP3 did not increase after exhaustive exercise and blunt trauma, but NIX only increased after exhaustive exercise. Its molecular mechanism needs to be further studied. **Level of Evidence III; Therapeutic Studies Investigating the Results of Treatment.**

Keywords: Autophagy-Related Proteins; Muscle, Skeletal; Wounds, Nonpenetrating; Muscle Fatigue.

RESUMEN

Objetivo: Estudiar los cambios temporales de los factores relacionados con la autofagia en el músculo esquelético de ratas tras el ejercicio exhaustivo y el traumatismo contuso. **Métodos:** Se dividieron 42 ratas SD macho en 7 grupos



con 6 ratas en cada grupo: grupo de control silencioso (C), inmediatamente después del ejercicio exhaustivo (E0), 24 horas después del ejercicio exhaustivo (E24), 48 horas después del ejercicio exhaustivo (E48), inmediatamente después de un traumatismo contuso (D0), 24 horas después de un traumatismo contuso (D24), 48 horas después de un traumatismo contuso (D48). Todos los grupos de ratas fueron sacrificados y rotulados, respectivamente, en diferentes momentos especificados anteriormente, y se extrajo el músculo gastrocnemio derecho, dividido en dos partes, una para los ARNm Lamp-2, BNIP3 y NIX mediante PCR cuantitativa fluorescente en tiempo real, y la otra para la proteína p62 mediante Western blotting. Resultados: (1) En comparación con el grupo C, los niveles de ARNm de p62, Lamp-2 y NIX en el grupo E48 aumentaron significativamente tras el ejercicio exhaustivo ($P < 0,05$), lo que sugiere que la autofagia aumentó en las 48 horas posteriores al ejercicio exhaustivo. (2) En comparación con el grupo C, los niveles de ARNm de p62 ARNm y Lamp-2 aumentaron significativamente inmediatamente después del traumatismo contuso ($P < 0,05$) y disminuyeron significativamente a las 48 horas después del traumatismo contuso ($P < 0,05$), lo que sugiere que la actividad de autofagia aumentó inmediatamente después del traumatismo contuso y disminuyó a las 48 horas después de la lesión. Conclusión: En general, hubo diferencias en cada fase de recuperación entre los modelos de traumatismo contuso y ejercicio exhaustivo, y los factores de autofagia basal y los factores de autofagia mitocondrial también fueron inconsistentes. Los factores de autofagia basal p62 y Lamp-2 aumentaron significativamente 48 horas después del ejercicio excéntrico exhaustivo e inmediatamente después del traumatismo contuso. El factor de autofagia mitocondrial BNIP3 no aumentó tras el ejercicio exhaustivo y el traumatismo contuso, pero NIX sólo aumentó tras el ejercicio exhaustivo. Su mecanismo molecular debe investigarse con más detalle. **Nivel de Evidencia III; Estudios Terapéuticos que Investigan los Resultados del Tratamiento.**

Descriptor: Proteínas Relacionadas con la Autofagia; Músculo Esquelético; Heridas no Penetrantes; Fatiga Muscular.

DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1517-8692202430022023_0218p

Artigo recebido em 24/03/2023 aprovado em 27/07/2023

INTRODUÇÃO

Após qualquer lesão muscular esquelética, é efetuado um reparo fisiológico na parte danificada. Esse sistema de autofagia também é um importante procedimento de reparo da lesão do músculo esquelético, além do reparo das células satélites musculares.¹ A autofagia mitocondrial refere-se principalmente ao dano de despolarização das mitocôndrias intracelulares sob o estímulo de ROS, deficiência nutricional, envelhecimento celular, etc. onde as mitocôndrias danificadas são especificamente envolvidas no autofagossomo e integradas ao lisossomo, completando assim a degradação das mitocôndrias danificadas e mantendo a estabilidade do ambiente intracelular.^{2,3} A BNIP3/NIX é uma importante via de autofagia mitocondrial em condições de hipóxia.⁴ A P62 é uma proteína receptora de autofagia, que pode levar substratos de autofagia ubiquitinados para o autofagossomo e desempenhar um papel importante na degradação de agregados de proteínas tóxicas. Como ela pode ser degradada junto com os substratos nos lisossomos, a p62 é frequentemente usada como um marcador para a degradação da autofagia.⁵ O processo de autofagia finaliza-se com a degradação do substrato de autofagia no lisossomo. A Lamp-2, como uma proteína da membrana do lisossomo, divide a fusão do autofagossomo e do lisossomo para promover a degradação do substrato.⁶

As lesões não-motoras também podem causar alterações na autofagia do músculo esquelético. Estudos demonstraram que as proteínas relacionadas à autofagia mitocondrial Drp1, BNIP3, Pink1 e Parkin estão significativamente elevadas após a lesão por congelamento do músculo esquelético; e, na disfunção mitocondrial em camundongos, quando a LC3II está aumentada, tende a induzir a autofagia mitocondrial.⁷

Neste estudo, foram estabelecidos dois modelos de lesão, como exercício excêntrico exhaustivo e trauma contuso agudo, sendo que os genes relacionados à autofagia Lamp-2, P62, expressão de mRNA de BNIP3/NIX e conteúdo da proteína p62 foram detectados imediatamente, 24 horas e 48 horas após o exercício exhaustivo e o trauma contuso, de modo a analisar os efeitos dessas distintas fases após a lesão do músculo esquelético nos fatores de autofagia, explorando a importância biológica relacionada e o seu possível mecanismo.

MÉTODOS

Amostra e agrupamento

Os animais selecionados eram ratos *Sprague Dawley* machos (8 semanas de idade, peso 130 ± 20 g, $n = 6$ por grupo) que foram obtidos do *Comparative Medicine Centre*, Jiangsu University (Jiangsu, China). Os ratos foram criados no Laboratório de Ciências do Movimento Humano da Universidade de Yangzhou. Todos os experimentos com animais enquadraram-se nas diretrizes do 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' (NIH Publications nº. 8023, revisado em 1978) e foram aprovados pelo Comitê de Cuidados e Uso de Animais da Universidade de Yangzhou para o tratamento de animais (Jiangsu, China): SCXK 2013-0011). Todos os ratos foram controlados a aproximadamente 22°C com um ciclo luminoso dia-noite de 12/12 h, alojados em uma gaiola doméstica de 30 x 41 cm, com 25 cm de altura, em uma sala limpa. Dieta sólida e água foram fornecidas *ad libitum*.

Agrupamento

Quarenta e dois ratos SD machos foram divididos em 7 grupos com 6 ratos em cada grupo: Grupo controle silencioso (C), imediatamente após trauma contuso (D0), 24 horas após trauma contuso (D24), 48 horas após trauma contuso (D48), imediatamente após exercício exhaustivo (E0), 24 horas após exercício exhaustivo (E24), 48 horas após exercício exhaustivo (E48). Todos os ratos foram submetidos à eutanásia por overdose de pentobarbital sódico (200 mg/kg, intraperitoneal), respectivamente, em diferentes momentos de acordo com os grupos acima. Os ratos foram amostrados imediatamente em 24 e 48 horas após o exercício exhaustivo e o trauma contuso, respectivamente. O músculo gastrocnêmio direito dos membros posteriores foi removido e armazenado a -80°C, depois misturado e moído na seção média da amostra para PCR em tempo real e *Western blotting*.

Uma única sessão de exercícios exaustivos na esteira

O protocolo de exercícios exaustivos graduados foi adaptado através duma modificação do método de Lin et al.⁸ Foi instalada uma grade de choque elétrico no obstáculo traseiro da esteira, para estimular o

animal ao exercício. Nos grupos de exercício exaustivo, os ratos foram testados por 15 a 20 minutos de exercício em esteira acomodada em 10 a 30 metros/minuto durante 6 dias. Durante o teste de exercício, eles correram em uma esteira inclinada de seis marchas graduais (-10°). A velocidade da esteira foi aumentada gradualmente para 10, 15, 20, 25 m/min por 10 minutos em cada marcha, e depois acelerada para 30 m/min até a exaustão dos ratos. O padrão de exaustão foi determinado quando os ratos não conseguiam mais acompanhar o ritmo da esteira na última velocidade, 30 metros/minuto, e nem conseguiam ficar eretos quando colocados de costas em repouso. O tempo médio de exaustão foi de 102 minutos em nosso experimento.

Trauma contuso

O trauma contuso no membro posterior dos ratos foi produzido usando o modelo de lesão por queda de massa descrito pela primeira vez por Kami et al⁹ e otimizado para o nosso laboratório. Esse trauma contuso foi moderadamente grave, não resultou em lesão óssea nem afetou a marcha dos animais feridos. Resumidamente, a técnica consiste em deixar cair um cilindro de 200 g de peso (o diâmetro da superfície basal é de 1 cm com 1,0 J de energia cinética) da altura de 50 cm na superfície medial do músculo gastrocnêmio direito de ratos anestesiados com éter etílico.

Transcrição reversa-PCR em tempo real

No presente estudo, a expressão do mRNA de BNIP3, NIX, Lamp-2 e p62 foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-PCR). Usando o Takara SYBR Premix Ex Taq TMII para mRNA, o cDNA sintetizado foi aplicado à RT-PCR em tempo real (ABI 9700 Thermal Cycler Dice, EUA) e analisado com o 7500 Real-Time PCR System (ABI, EUA). Usando o RNAiso Plus (Takara Bio, Japão), o RNA total foi extraído da porção proximal do músculo gastrocnêmio de acordo com as instruções do fabricante. Usando o kit Firststrand cDNA Synthesis, as amostras (~10 ng de RNA) foram submetidas à transcrição reversa de acordo com o protocolo do fabricante [PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) para mRNA, Takara Bio, Japão].

O GAPDH foi usado como padrão interno para normalizar a quantidade de RNA total presente em cada reação. As condições do ciclo em tempo real foram 95°C por 30 segundos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 5 segundos e a 60°C por 34 segundos para o mRNA. Os níveis de expressão de cada transcrito de mRNA foram determinados pela normalização de cada grupo para o grupo sedentário pelo método 2-ΔΔCT. Os primers usados para a detecção do cDNA de ratos foram os seguintes, projetados pela Sangon Biotech (Xangai, China):

P62	FORWARD: CCAGCACAGGCACAGAAGACAAG REVERSE: TGAGCCAGCCGCTTCATCC
Lamp-2	FORWARD: CCTAGGAGCCGTTCAAGTCCA REVERSE: GCCCAAGAGACAGCGAATCC
BNIP3	FORWARD: AGCGTTCCAGCTCCGCTCTC REVERSE: GAGAGTAGCTGTGCGCTTCGG
NIX	FORWARD: GTTCCTTCTCGTCTTCCATCCAC REVERSE: GGCTCCACTTCTCATGCTTAG
GAPDH	FORWARD: AATGGTGAAGGTCCG TGTGAACG REVERSE: TCGCTCTGGAAGATGGTGATGG

Análises de Western blot

Uma quantidade adequada de músculo gastrocnêmio misto foi retirada e triturada. O lisado RIPA contendo PMSF (PMSF: RIPA = 100: 1, Shanghai Biyuntian Co., China) foi adicionado às amostras. Após a homogeneização elétrica, as amostras foram sonicadas e lisadas a 4°C durante a noite e, em seguida, centrifugadas a 12.000 rpm, em 4°C,

por 30 minutos. O sobrenadante foi subbaldado. A amostra acima foi preparada a 20 ug/tempo, e a eletroforese em gel de poli(acrilamida SDS) foi realizada (instrumento de eletroforese 325BR051391, BIO-RAD, EUA). Concentração de gel de separação 12%), sendo transferido para uma membrana de PVDF por 1 hora e bloqueado com leite desnatado a 5%. O anticorpo primário Anti-p62 (Sangon Biotech Co., China, 1:500) e a referência interna Anti-GAPDH (Sangon Biotech Co., China, 1:10000) foram diluídos com leite desnatado a 5% de acordo com a proporção das instruções do anticorpo. Em seguida, a membrana foi embebida e incubada a 4°C em um agitador tridimensional durante a noite. A membrana foi lavada quatro vezes e incubada com o anticorpo secundário (Sangon Biotech Co., 1:5000) por uma hora. Em seguida, a membrana foi desenvolvida por ECL (ECL Plus Ultra Sensitive Kit, Phygene Life Sci Co., China). A proteína-alvo e a GAPDH são avaliadas na mesma membrana. O resultado final foi expresso como a razão OD da proteína-alvo p62 para a referência interna GAPDH. O software Image Lab5.1 foi usado para analisar o valor de cinza.

Análise estatística

A significância estatística foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey para corrigir comparações múltiplas (SPSS 21.0, SPSS Inc). Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (SEM). P < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Nos grupos de exercícios excêntricos exaustivos, em comparação com o grupo C, o nível de expressão do mRNA da p62 no grupo E48 aumentou significativamente (P<0,05), mas não houve diferença significativa entre os grupos E0 e E24. O nível de mRNA do Lamp-2 no grupo E48 foi significativamente elevado (p<0,05), enquanto nos grupos E0 e E24 foi significativamente reduzido (p<0,05). O nível de expressão do mRNA do NIX no grupo E48 foi significativamente aumentado (P<0,05), enquanto o do grupo E0 foi significativamente reduzido (P<0,05). O nível de expressão de mRNA do BNIP3 não foi significativamente diferente no grupo E48, mas diminuiu significativamente nos grupos E0 e E24 (P<0,05) (Tabela 1, Figura 1). Por outro lado, em comparação com o grupo C, a expressão da proteína p62 nos grupos E0 e E24 não apresentou diferenças significativas, embora tenha aumentado significativamente no grupo E48 (P<0,05). Em comparação com o grupo E0, os fatores acima foram significativamente aumentados no grupo E48 (P<0,05), mas não houve diferença significativa no grupo E24 (exceto NIX mRNA no E24). (Tabela 2, Figura 2)

Nos grupos de trauma contuso, em comparação com o grupo C, os níveis de mRNA de p62 e mRNA de Lamp-2 no grupo D0 aumentaram significativamente (P<0,05), enquanto os níveis nos grupos D24 e D48 diminuíram significativamente (P<0,05); em comparação com o grupo D0, os níveis de mRNA de p62 e mRNA de Lamp-2 no grupo D48 diminuíram significativamente (P<0,01). Por outro lado, em comparação com o grupo C, os níveis de expressão do mRNA do BNIP3 e do mRNA do NIX não

Tabela 1. Expressão dos genes em todos os grupos em diferentes momentos após o exercício exaustivo (E0, E24, E48) e contusão (D0, D24, D48).

grupo(n=6)	p62mRNA	Lamp-2 mRNA	BNIP3 mRNA	NIX mRNA
C	1,00±0,30	1,00±0,49	1,00±0,17	1,00±0,39
E0	0,81±0,14	0,43±0,27*	0,33±0,30*	0,59±0,22*
E24	0,83±0,39	0,38±0,19*	0,53±0,49*	1,38±0,32*#
E48	2,71±0,57 *#	1,26±0,46*#	0,77±0,23#	1,29±0,17*#
D0	5,59±0,84 *	1,90±0,62 *	1,04±0,29	0,79±0,25
D24	1,74±0,49 *	0,42±0,25 *&	0,31±0,28*&	0,39±0,26*&
D48	0,22±0,15 *&&	0,21±0,19*&&	0,05±0,34*&&	0,29±0,13*&

[*] Diferença significativa em comparação com o controle, P < 0,05. [#] Diferença significativa em comparação com E0, P < 0,05. [&] Diferença significativa em comparação com D0, P < 0,05. [&&] P < 0,01. n = 6/grupo.

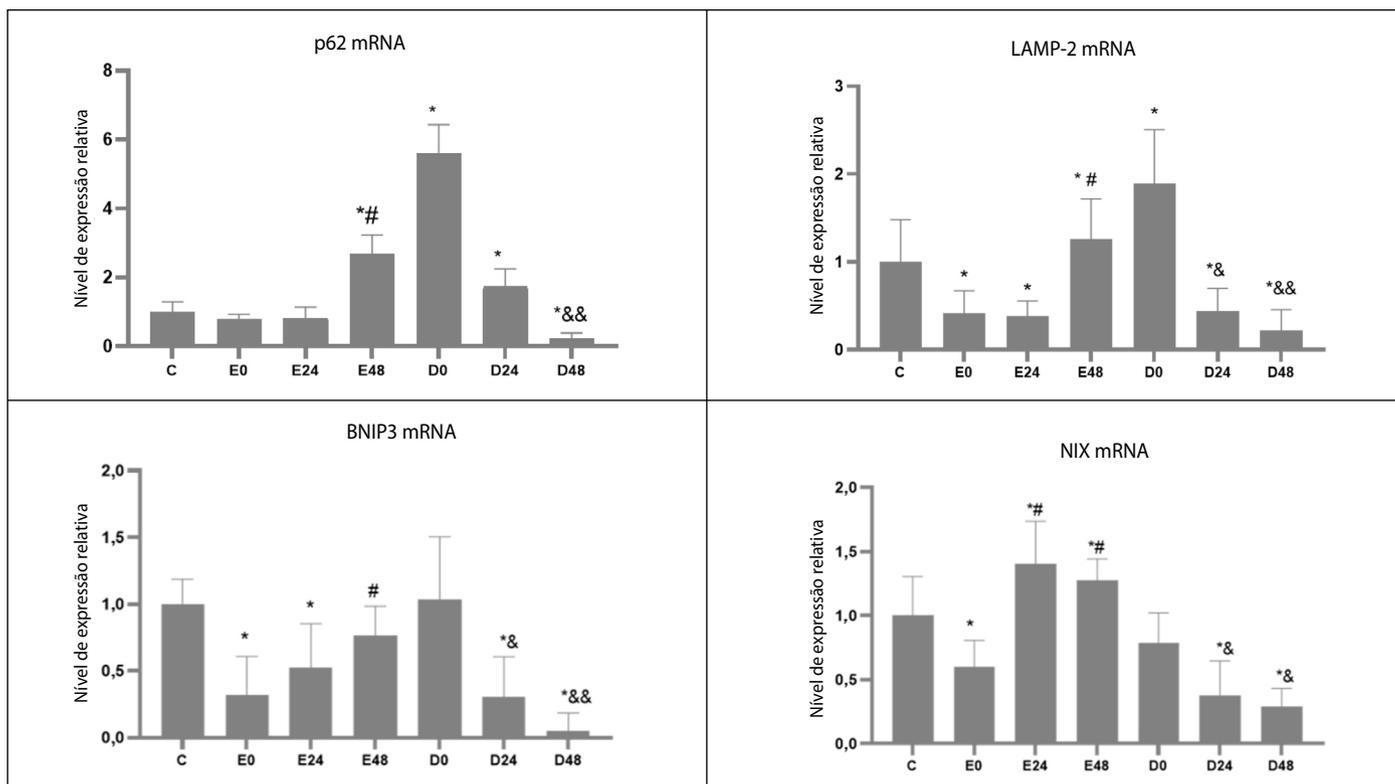


Figura 1. Expressão de genes em todos os grupos em diferentes momentos após exercício exaustivo (E0, E24, E48) e trauma contuso (D0, D24, D48). (A) As expressões dos genes p62, (B) Lamp-2, (C) BNIP3, (D) NIX foram medidas usando qRT-PCR. As datas são médias \pm SEM, n = 6/grupo. [*] Diferença significativa em comparação com o controle, P < 0,05. [#] Diferença significativa em comparação com E0, P < 0,05. [&] Diferença significativa em comparação com D0, P < 0,05. [&&] P < 0,01. n = 6/grupo.

Tabela 2. Expressão proteica de p62 em diferentes momentos após exercício exaustivo (E0, E24, E48) e trauma contuso (D0, D24, D48).

grupo(n=6)	expressão da proteína p62
C	0,5098 \pm 0,2286
E0	0,5301 \pm 0,1697
E24	0,5689 \pm 0,1588
E48	0,7012 \pm 0,2409*#
D0	0,5902 \pm 0,2089
D24	0,5697 \pm 0,1803
D48	0,5778 \pm 0,1279

[*] Diferença significativa em comparação com o controle, P < 0,05. [#] Diferença significativa em comparação com E0, P < 0,05.

foram significativamente diferentes no grupo D0, mas diminuíram significativamente no grupo D24 e no grupo D48 (P<0,05). Em comparação com o grupo D0, ela diminuiu significativamente nos grupos D24 e D48 (P<0,05) (P<0,01) (Tabela 1, Figura 1). Além disso, em comparação com o grupo C, não houve diferença significativa na expressão da proteína p62 nos grupos de trauma contuso. (Tabela 2, Figura 2)

DISCUSSÃO

O exercício excêntrico exaustivo pode causar microdanos e alterações ultraestruturais no músculo esquelético, o que foi demonstrado por estudos anteriores. Alterações ultraestruturais também foram relatadas em trabalhos anteriores neste laboratório. O trauma contuso pode causar um inchaço relativamente significativo das fibras musculares, mas as alterações dinâmicas da autofagia em ambos os modelos de lesão ainda não estão claras, o que motivou este estudo. As diferenças e o grau de autofagia nos dois modelos serão explorados e avaliados por comparação síncrona.

Influência do treinamento físico nos fatores relacionados à autofagia

Há poucos relatos sobre fatores relacionados à autofagia em modelos de exercício exaustivo e trauma contuso agudo. Relatórios anteriores

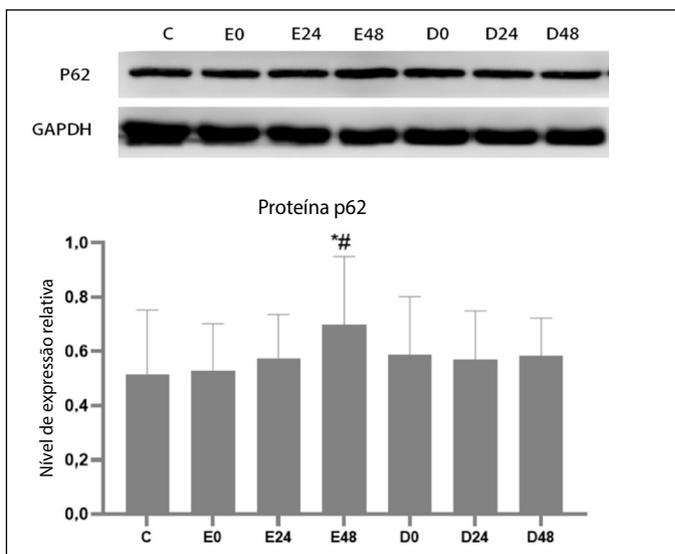


Figura 2. A expressão da proteína p62 foi medida por Western Blot em diferentes momentos em todos os grupos após trauma contuso (D0, D24, D48) e exercício exaustivo (E0, E24, E48). As datas são médias \pm SEM, n = 6/grupo. [*] Diferença significativa em comparação com o controle, P < 0,05 [#]. [Diferença significativa em comparação com o E0, P < 0,05.

mostraram que o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) melhora o desempenho atlético de forma mais eficaz do que o treinamento contínuo de intensidade moderada (CIM), e que essa melhora está associada à adaptação basal da autofagia e à função mitocondrial dos músculos cardíacos e esqueléticos. Os resultados mostraram que as expressões de Beclin-1, BNIP3, P62, ATG-3, LC3-II e LC3II/LC3-1 estavam significativamente aumentadas no músculo sóleo e no miocárdio após o HIIT isolado.^{10,11} Outros relatórios mostraram que a regulação da autofagia está enfraquecida no músculo esquelético idoso. Mas os níveis de autofagia podem ser aumentados com algum treinamento físico.^{12,13}

Com relação à autofagia mitocondrial mediada por BNIP3/NIX, estudos demonstraram que quatro semanas de exercício em esteira de intensidade moderada promoveram a autofagia mitocondrial mediada por BNIP3, enquanto o exercício de alta intensidade bloqueou a via de autofagia mitocondrial mediada por BNIP3. Após quatro semanas de exercícios de alta intensidade, a expressão das proteínas p62 e BNIP3 diminuiu. Além disso, o Bnip3 e o Nix têm respostas diferentes ao exercício. O treinamento físico mais a restrição alimentar podem efetivamente promover a expressão significativa da proteína Nix no gastrocnêmio de camundongos, enquanto o BNIP3 não tem expressão significativa.¹⁴⁻¹⁶

Wohlgemuth et al. descobriram que a expressão do mRNA e da proteína LC3 e LAMP-2 no músculo esquelético de ratos machos apresentou um declínio relacionado à idade, e o exercício autônomo combinado com a restrição calórica poderia aumentar a expressão de LC3 e LAMP2 para manter certa atividade de autofagia no músculo esquelético, promovendo a sobrevivência celular.¹⁷

Os resultados desse experimento mostraram que o mRNA da p62 diminuiu significativamente imediatamente e 24 horas após o exercício exaustivo, e aumentou significativamente às 48 horas. Após exercícios exaustivos, as proteínas mal clivadas e o dano oxidativo das proteínas aumentaram gradualmente, o que ativou a transcrição do gene p62 e promoveu o isolamento de proteínas tóxicas pelos autofagossomos. O mRNA do Lamp-2 diminuiu significativamente imediatamente e 24 horas após o exercício exaustivo, e aumentou significativamente às 48 horas. Os resultados indicaram que os autofagossomos intracelulares aumentaram gradualmente, e o aumento de Lamp-2 promoveu a fusão de autofagossomos e lisossomos e a degradação de substratos na autofagia. O BNIP3 após o exercício exaustivo foi menor do que no grupo de controle, e o NIX diminuiu significativamente imediatamente após o exercício e aumentou significativamente às 24 e 48 horas. Esses resultados sugerem que a autofagia mitocondrial mediada por Nix pode ser ativada mais facilmente após exercícios exaustivos. A proteína P62 não diminuiu significativamente em cada grupo após exercício exaustivo e trauma contuso, o que pode indicar que os efeitos da lesão nos genes e proteínas da autofagia não estão sincronizados, e as proteínas da autofagia podem desempenhar um papel somente quando o substrato a ser degradado se acumula até certo ponto.

Efeitos da lesão muscular nos fatores relacionados à autofagia

Também há poucos relatos sobre fatores relacionados à autofagia no modelo de trauma contuso agudo. Estudos recentes demonstraram que os marcadores de fissão mitocondrial apresentam-se elevados e as proteínas de fusão mostram-se diminuídas após a transecção do nervo ciático.¹⁸ As expressões totais dos marcadores mitocondriais Beclin1, PINK1, LC3-II, p62 e ULK1 fosforilada (S555) apresentaram-se, também, aumentadas. Como resultado, a paralisia do gastrocnêmio leva a um aumento progressivo da expressão da proteína mitocondrial e da fissão mitocondrial. O reparo ou a intervenção medicamentosa para limitar a fagocitose mitocondrial excessiva podem ser terapias eficazes para proteger a massa e a função do músculo paralisado. Além disso, o exercício aeróbico também teve efeitos eficazes sobre vários fatores relacionados à autofagia no músculo esquelético de ratos hipertensos e com pressão arterial normal.¹⁹

Com relação ao reparo do trauma contuso agudo do músculo esquelético,²⁰ estudos demonstraram que as expressões de P62 e LC3-II são inicialmente altas e depois baixas. As expressões de LC3-II e P62 aumentaram significativamente nos grupos de 3, 5 e 7 dias após trauma contuso agudo em comparação com o grupo controle e o grupo de 14

dias. Os resultados sugerem que a taxa de reparo de danos pode estar relacionada ao nível de autofagia.

Os resultados desse experimento mostraram que, em comparação com o grupo C, os níveis de mRNA p62 e mRNA Lamp-2 no grupo D0 aumentaram significativamente no grupo de trauma contuso ($P < 0,05$), enquanto os níveis nos grupos D24 e D48 diminuíram significativamente ($P < 0,05$). Por outro lado, em comparação com o grupo C, os níveis de expressão do mRNA do BNIP3 e do mRNA do NIX não foram significativamente diferentes no grupo D0, mas diminuíram significativamente no grupo D24 e no grupo D48 ($P < 0,05$). Os fatores de autofagia basal e os fatores de autofagia mitocondrial eram inconsistentes, e seu mecanismo molecular necessitam de investigações futuras.

BNIP3/NIX e autofagia mitocondrial

Seis semanas de treinamento de exercícios de resistência combinados com melhorias na dieta podem aliviar o declínio do nível de autofagia em camundongos nutricionalmente obesos. Durante o processo de melhoria da autofagia das mitocôndrias do músculo esquelético em camundongos nutricionalmente obesos, os níveis de transcrição do sinal NIX/BNIP3 e PINK1/Parkin são aumentados de forma adaptativa, de modo a regular o número e a função das mitocôndrias do músculo esquelético. BNIP3 e NIX são proteínas multifuncionais relacionadas à membrana externa mitocondrial. O BNIP3 regula as mitocôndrias durante a hipóxia, e as mitocôndrias exigem o NIX durante o desenvolvimento da linhagem eritroide. Já houve uma discussão sobre os avanços recentes no campo da fagocitose mitocondrial mediada por BNIP3 e NIX.²¹ Nisso, percebeu-se que a função prejudicada do BNIP3 ou do NIX pode levar a um controle de qualidade mitocondrial defeituoso, o que pode levar à disfunção mitocondrial e à morte celular.²¹

Alguns estudos relataram que o Bnip3 induz a transposição de DRP1 nas células mitocondriais, e a divisão mitocondrial mediada por DRP1 está associada ao aumento da autofagia.²² A inibição de DRP1 pode reduzir a autofagia mediada por BNIP3 e inibir a divisão mitocondrial ou aumentar a morte de cardiomiócitos que a autofagia leva à superexpressão de BNIP3. Outros estudos demonstraram que o nocaute do gene BNIP3 pode reduzir a fragmentação mitocondrial e levar à restauração da morfologia e da integridade mitocondrial. Os marcadores de estresse do retículo endoplasmático e apoptose mitocondrial também foram significativamente reduzidos durante o nocaute do gene BNIP3. Em contrapartida, o aumento da expressão de BNIP3 diminuiu a função diastólica e sistólica do miocárdio.²³

Em conclusão, a baixa expressão de BNIP3/NIX durante o período de lesão grave em 24 e 48 horas após o trauma contuso pode reduzir a autofagia excessiva de mitocôndrias e manter uma certa quantidade de função mitocondrial, reduzindo assim a morte celular.

CONCLUSÃO

De modo geral, houve diferenças em cada fase de recuperação entre os modelos de trauma contuso e de exercício exaustivo, e os fatores de autofagia basal e os fatores de autofagia mitocondrial também foram inconsistentes. Os fatores de autofagia basal p62 e Lamp-2 aumentaram significativamente 48 horas após o exercício excêntrico exaustivo e imediatamente após o trauma contuso. O fator de autofagia mitocondrial BNIP3 não aumentou após o exercício exaustivo e o trauma contuso, mas o NIX só aumentou após o exercício exaustivo. Seu mecanismo molecular precisa ser mais bem estudado.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

- Baechler BL, Bloemberg D, Quadrilatero J. Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation. *Autophagy*. 2019;15(9):1606-19.
- Call JA, Nischenko AS. Autophagy: an essential but limited cellular process for timely skeletal muscle recovery from injury. *Autophagy*. 2020;16(7):1344-7.
- Nischenko AS, Tehrani KF, Yin A, Yin H, Mortensen L, Call J. Autophagy Flux: A Bottleneck in the Clearance of Damaged Organelles and Proteins after Skeletal Muscle Injury. *FASEB J*. 2020;34(Suppl 1):1-1. doi:10.1096/fasebj.2020.34.s1.05440.
- Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem*. 2017;61(6):609-24.
- Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(16):9082-7.
- Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*. 2008;4(4):510-2.
- Nischenko AS, Southern WM, Tehrani KF, Qualls AE, Flemington AB, Mercer GH, et al. Mitochondrial-specific autophagy linked to mitochondrial dysfunction following traumatic freeze injury in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020;318(2):C242-52.
- Lin WT, Yang SC, Tsai SC, Huang CC, Lee NY. L-Arginine attenuates xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in hearts of rats during exhaustive exercise. *Br J Nutr*. 2006;95(1):67-75.
- Kami K, Masuhara M, Kashiba H, Kawai Y, Noguchi K. Changes of vinculin and extracellular matrix components following blunt trauma to rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*. 1993;25(7):832-4.
- Li FH, Li T, Su YM, Ai JY, Duan R, Liu T. Cardiac basal autophagic activity and increased exercise capacity. *J Physiol Sci*. 2018;68(6):729-42.
- Li FH, Li T, Ai JY, Sun L, Min Z, Duan R, et al. Beneficial autophagic activities, mitochondrial function, and metabolic phenotype adaptations promoted by high-intensity interval training in a rat model. *Front Physiol*. 2018;9:571. doi:10.3389/fphys.2018.00571.
- Mejias-Pena Y, Rodriguez-Miguel P, Fernandez-Gonzalo R, Martinez-Florez S, Almar M, de Paz JA, et al. Effects of aerobic training on markers of autophagy in the elderly. *Age (Dordr)*. 2016;38(2):33. doi:10.1007/s11357-016-9897-y.
- Kim YA, Kim YS, Oh SL, Kim HJ, Song W. Autophagic response to exercise training in skeletal muscle with age. *J Physiol Biochem*. 2013;69(4):697-705.
- Altea R, He CC. Regulation of Exercise-Induced Autophagy in Skeletal Muscle. *Cur Pathobiol Rep*. 2017;5(2):177-86. doi:10.1007/s40139-017-0135-9.
- Martin RM, Morales AD, Calbet JA. Exercise-mediated modulation of autophagy in skeletal muscle. *Scan J Med Sci Sports*. 2018;28(3):772-81. doi:10.1111/sms.12945.
- Brandt N, Gunnarsson TP, Bangsbo J, Pilegaard H. Exercise and exercise training-induced increase in autophagy markers in human skeletal muscle. *Physiol Rep*. 2018;6(7):e13651. doi:10.14814/phy2.13651.
- Wohlgemuth SE, Seo AY, Marzetti E, Lees HA, Leeuwenburgh C. Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging effects of calorie restriction and life-long exercise. *Exp Gerontol*. 2010;45(2):138-48.
- Graham ZA, Harlow L, Bauman WA, Cardozo CP. Alterations in mitochondrial fission, fusion, and mitophagic protein expression in the gastrocnemius of mice after a sciatic nerve transection. *Muscle Nerve*. 2018;58(4):592-9.
- McMillan EM, Paré MF, Baechler BL, Graham DA, Rush JWE, Quadrilatero J. Autophagic signaling and proteolytic enzyme activity in cardiac and skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats following chronic aerobic exercise. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119382. doi:10.1371/journal.pone.0119382.
- Luo A, Tang CL, Huang SQ, Zhao DD, Zhang AN, Guo QH, et al. Changes in expression of autophagy-related factors during acute blunt trauma repair of skeletal muscle. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2018;34(2):97-101.
- Ney PA. Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(10 Pt B):2775-83.
- Lee Y, Lee HY, Hanna RT, Gustafsson AB. Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(5):H1924-31.
- Fordjour PA, Wang L, Gao H, Li L, Wang Y, Nyagblordzro M, et al. Targeting BNIP3 in inflammation-mediated heart failure: a novel concept in heart failure therapy. *Heart Fail Rev*. 2016;21(5):489-97.