

EFEITOS DE EXERCÍCIO EXAUSTIVO E DE CONTUSÕES SOBRE FATORES RELACIONADOS COM AUTOFAGIA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS

EFFECTS OF EXHAUSTIVE EXERCISE AND CONTUSION ON AUTOPHAGY-RELATED FACTORS IN SKELETAL MUSCLE OF RATS

EFFECTOS DEL EJERCICIO EXHAUSTIVO Y DE CONTUSIÓN SOBRE FACTORES RELACIONADOS A LA AUTOFAGIA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATONES

Tongbin Pan¹ 
(Profissional de Educação Física)
Mengjin Ji¹ 
(Profissional de Educação Física)
Jianjian Jiao¹ 
(Profissional de Educação Física)
Fengyang Yin¹ 
(Profissional de Educação Física)
Cheng Qin¹ 
(Profissional de Educação Física)
Tao Yang¹ 
(Profissional de Educação Física)

1. Yangzhou University, Faculdade de Educação Física, Yangzhou, China.

Correspondência

Pan Tongbin
College of Physical Education,
Yangzhou University, Yangzhou
City, Jiangsu Province, China.
225009. panlichina@sina.com

RESUMO

Objetivo: Estudar os efeitos do exercício exaustivo e da contusão sobre a expressão dos fatores relacionados com a autofagia das proteínas Beclina 1, LC3 e PINK-1 no músculo esquelético de ratos. **Métodos:** Quarenta de dois ratos SD machos foram divididos randomicamente em 7 grupos com 6 ratos cada um: C, D0, D24, D48, E0, E24 e E48. Os ratos de cada um dos grupos foram submetidos à eutanásia e dissecados nos diferentes pontos de tempo de acordo com os grupos acima. Cada músculo quadríceps femoral dos membros posteriores esquerdos foi removido e dividido em duas partes, uma para RNAm de Beclina 1, LC3 e PINK-1 por PCR quantitativa fluorescente em tempo real e a outra para a proteína LC3 por Western blotting. **Resultados:** Em comparação com o grupo C, o teor de RNAm em Beclina 1, PINK-1 e LC3 no grupo exercício exaustivo imediato (E0) foi significativamente reduzido ($p < 0,01$). Contudo, os níveis de RNAm em PINK-1 e LC3 e a proteína LC3 em células do músculo esquelético aumentaram significativamente nas 48 horas pós-depleção (E48) ($p < 0,05$), sugerindo que a autofagia celular tendeu a aumentar durante o período de recuperação. Em comparação com o grupo C, o teor de RNAm de Beclina 1, RNAm de Pink-1 e RNAm de LC3 no grupo contusão imediata (D0) aumentou significativamente ($p < 0,01$) o que foi seguido por tendência de queda. **Conclusão:** Em geral, foram encontradas diferenças entre os modelos de contusão e de exercício exaustivo em cada fase de recuperação. A expressão gênica dos fatores relacionados com a autofagia não foi alta na fase de recuperação do exercício exaustivo inicial e, subsequentemente, seguiu tendência ascendente. Porém, os fatores acima aumentaram significativamente nas fases de recuperação imediata e inicial depois de contusão. O trauma contuso pode ser mais grave do que a lesão induzida por exercício exaustivo, de modo que a autofagia tem início mais cedo, de acordo com as mudanças nos fatores relacionados com a autofagia. **Nível de Evidência III; Estudos terapêuticos - Investigação dos resultados do tratamento.**

Descritores: Contusões; Proteína Beclina 1; Exercício Físico.

ABSTRACT

Objective: To study the effects of exhaustive exercise and contusion on autophagy-related factors Beclin1, LC3 and PINK1 expression in the skeletal muscle of rats. **Methods:** Forty-two male SD rats were randomly divided into 7 groups, 6 rats in each group: C, D0, D24, D48, E0, E24, and E48. Each group of rats was killed and dissected at the different respective time points specified above. The whole quadriceps femoris of the left hind limbs were removed and divided into two parts, one for mRNAs of Beclin1, LC3 and PINK1 by real-time fluorescent quantitative PCR, and the other for LC3 protein by Western blotting. **Results:** Compared with group C, the contents of Beclin1 mRNA, PINK1 mRNA, and LC3 mRNA in the immediate exhaustive exercise group (E0) were significantly reduced $p < 0.01$. However, the levels of PINK1 mRNA, LC3 mRNA, and LC3 protein in skeletal muscle cells increased significantly in the 48 hours after exhaustion (E48) $p < 0.05$, suggesting that cell autophagy had an increasing trend during the recovery period. Meanwhile, compared with the C group, the contents of Beclin1 mRNA, PINK1 mRNA, and LC3 mRNA in the immediate blunt contusion group (D0) increased significantly $p < 0.01$ and were followed by a downward trend. **Conclusion:** Generally, there were differences between the blunt contusion and exhausted exercise models at each recovery phase. The gene expression of the autophagy-related factors was not high in the early exhaustive exercise recovery phase and subsequently followed an upward trend. But the above factors increased significantly in the immediate and early recovery phases after blunt contusion. Injury from blunt contusion may be more severe than exhaustive exercise-induced-injury, so the autophagy starts earlier according to the changes in autophagy-related factors. **Level of evidence III; Therapeutic studies investigating the results of treatment.**

Keywords: Contusion; Beclin1; Exercise.



RESUMEN

Objetivo: Estudar los efectos del ejercicio exhaustivo y de la contusión sobre la expresión de los factores relacionados a la autofagia de las proteínas Beclina 1, LC3 y PINK-1 en el músculo esquelético de ratones. **Métodos:** Cuarenta y dos ratones SD machos fueron divididos aleatoriamente en 7 grupos con 6 ratones cada uno: C, D0, D24, D48, E0, E24 y E48. Los ratones de cada uno de los grupos fueron sometidos a eutanasia y disecados en los diferentes puntos de tiempo de acuerdo con los grupos encima. Cada músculo cuádriceps femoral de los miembros posteriores izquierdos fue removido y dividido en dos partes, una para RNAm de Beclina 1, LC3 y PINK-1 por PCR cuantitativa fluorescente en tiempo real y la otra para la proteína LC3 por Western blotting. **Resultados:** En comparación con el grupo C, el tenor de RNAm en Beclina 1, PINK-1 y LC3 en el grupo ejercicio exhaustivo inmediato (E0) fue significativamente reducido ($p < 0,01$). Con todo, los niveles de RNAm en PINK-1 y LC3 y la proteína LC3 en células del músculo esquelético aumentaron significativamente en las 48 horas post-depleción (E48) ($p < 0,05$), sugiriendo que la autofagia celular tendió a aumentar durante el período de recuperación. En comparación con el grupo C, el tenor de RNAm de Beclina 1, RNAm de Pink-1 y RNAm de LC3 en el grupo contusión inmediata (D0) aumentó significativamente ($p < 0,01$) lo que fue seguido por tendencia de caída. **Conclusión:** En general, fueron encontradas diferencias entre los modelos de contusión y de ejercicio exhaustivo en cada fase de recuperación. La expresión génica de los factores relacionados con la autofagia no fue alta en la fase de recuperación del ejercicio exhaustivo inicial y, subsecuentemente, siguió tendencia ascendente. Sin embargo, los factores encima aumentaron significativamente en las fases de recuperación inmediata e inicial después de contusión. El trauma contuso puede ser más grave que la lesión inducida por ejercicio exhaustivo, de modo que la autofagia tiene inicio más temprano, de acuerdo con los cambios en los factores relacionados a la autofagia.

Nivel de Evidencia III; Estudios terapéuticos - Investigación de los resultados del tratamiento.

Descriptor: Contusiones; Beclina-1; Ejercicio Físico.

DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1517-8692202127062020_0022

Artigo recebido em 17/03/2020 aprovado em 05/04/2021

INTRODUÇÃO

Depois de lesão do músculo esquelético, o corpo repara a parte danificada. Além do reparo das células musculares satélites, a autofagia também é um procedimento importante de recuperação de lesões do músculo esquelético.^{1,2} A autofagia pode remover células danificadas e é uma medida protetora ativa das células.³ Essa autofagia das células musculares esqueléticas pode transportar proteínas e organelas danificadas, degradadas ou envelhecidas para lisossomas para digestão e degradação, o que pode fornecer certos substratos energéticos e sintéticos para a regeneração das fibras musculares e inibir a apoptose das células do músculo esquelético.⁴ A ressíntese de mitocôndrias e proteínas contráteis durante a adaptação do músculo esquelético também tem certo efeito sobre células musculares danificadas. Assim sendo, a autofagia mitocondrial do músculo esquelético tem recebido grande atenção no processo de reparo de lesões do músculo esquelético.⁵

Alguns relatos constataram que há cinco estágios de autofagia, a saber: iniciação, nucleação, extensão, fusão e degradação. Em estados de desequilíbrio de energia, a autofagia tem iniciação e nucleação. Nesse processo, a proteína 1 de interação com Bcl-2 (Beclina 1) atua como uma das proteínas importantes e forma a via regulatória do complexo Beclina 1-Bcl-2 e afeta a fase de extensão da autofagia.⁶ A proteína 1 associada aos microtúbulos citoplasmáticos, cadeia leve 3 (LC3) é uma proteína marcadora do processo de autofagia celular, principalmente na fase de nucleação, e seu nível de expressão pode refletir a atividade da autofagia. Na via de sinalização putativa induzida por PTEN cinase 1 (PINK-1)/parkina, a PINK-1 e a parkina foram proteínas identificadas previamente e regulam a autofagia mitocondrial; a parkina é encontrada com expressão elevada em vários tecidos de mamíferos, incluindo cérebro, músculo esquelético e coração, o que sugere que PINK-1/parkina pode ter uma ampla gama de efeitos fisiológicos na regulação da autofagia mitocondrial.⁷

O exercício exaustivo excêntrico pode levar a microlesões do músculo esquelético e a alterações ultraestruturais comprovadas pela literatura. O trauma contuso pode causar inchaço relativamente óbvio das fibras musculares, mas as mudanças dinâmicas da autofagia nos dois modelos de lesão não são claras. Neste artigo, os autores estabelecem diferentes modelos experimentais de lesão muscular esquelética para estudar comparativamente as mudanças dinâmicas de fatores relacionados com a autofagia e os níveis de autofagia depois de lesão muscular esquelética.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e randomização

Ratos Sprague Dawley machos (8 semanas de idade, peso 130 ± 20 g, $n = 6$ por grupo) foram obtidos do Centro de Medicina Comparativa, Jiangsu University (Jiangsu, China). Os ratos foram reproduzidos e criados no Laboratório de Ciências do Movimento Humano na Yangzhou University. Todos os experimentos com animais se enquadram nas diretrizes do "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH, Publicação no. 8023, revisado em 1978) e aprovado pelo Animal Care and Use Committee da Yangzhou University para o tratamento de animais (Jiangsu, China). Todos os ratos foram alojados em uma gaiola doméstica de 30×41 cm e 25 cm de altura em uma sala limpa, com temperatura de aproximadamente 22°C e um ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas. A dieta sólida e a água foram fornecidas *ad libitum*.

Randomização: Os 42 ratos Sprague Dawley foram divididos randomicamente em 7 grupos: (1) controle sedentário (C, $n = 6$), (2) imediatamente depois de contusão (D0, $n = 6$), (3) 24 horas depois de contusão (D24, $n = 6$), (4) 48 horas depois de contusão (D48, $n = 6$), (5) imediatamente depois de exercício exaustivo (E0, $n = 6$), (6) 24 horas depois de exercício exaustivo (E24, $n = 6$), (7) 48 horas depois de exercício exaustivo (E48, $n = 6$). Todos os ratos foram sacrificados com alta dose de pentobarbital sódico (200 mg/kg, intraperitoneal) em diferentes pontos do tempo, de acordo com os grupos acima. Após a eutanásia, os ratos foram dissecados imediatamente, 24 e 48 horas depois de exercício exaustivo e contusão, respectivamente. Todo o músculo quadríceps femoral esquerdo dos membros posteriores foi retirado e armazenado a -80°C e, a seguir, a seção intermediária da amostra foi misturada e triturada para realizar a PCR em tempo real e *Western blotting*.

Sessão única de exercício exaustivo em esteira

O protocolo de exercício exaustivo gradativo foi adaptado com uma modificação do método de Lin *et al.*⁸ Na parte de trás da esteira, foi instalada uma grade eletrificada para forçar o animal a se exercitar. Nos grupos de exercício exaustivo, os ratos foram testados por 15 a 20 minutos em esteira ergométrica a 10 a 30 metros/minuto por 6 dias. Durante o teste ergométrico, os ratos correram em seis pistas inclinadas (-10°). A velocidade da esteira foi aumentada gradativamente para 10, 15, 20, 25 m/min., com duração de 10 minutos em cada; a seguir, foi acelerada para 30 m/min. até

a exaustão dos ratos. O padrão de exaustão é que os ratos não consigam mais acompanhar a esteira na última velocidade de 30 metros/minuto e não consigam ficar em pé quando colocados de costas em repouso. O tempo médio de exaustão foi de 105 minutos em nosso experimento.

Contusão

O trauma contusão no membro posterior dos ratos foi produzida usando o modelo de lesão em queda de massa descrito pela primeira vez por Kami *et al.*⁹ e otimizado para nosso laboratório. Essa contusão foi moderadamente grave e não resultou em lesões ósseas nem afetou a marcha dos animais. Resumidamente, a técnica envolve a queda de 200 g de peso de um cilindro (diâmetro da superfície de base de 1 cm com 1,0 J de energia cinética) da altura de 50 cm na superfície medial do quadríceps femoral esquerdo de ratos anestesiados com éter etílico.

PCR da transcrição reversa em tempo real

Neste estudo, a expressão do RNAm em Beclina 1, LC3 e PINK-1 foi avaliada por reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-PCR). Usando Takara SYBR Premix Ex Taq TM II para RNAm, aplicou-se DNac sintetizado foi aplicado a RT-PCR em tempo real (ABI 9700 Thermal Cycler Dice, EUA) e analisado com 7500 Real-Time PCR System (ABI, EUA). Com o reagente RNAiso Plus (Takara Bio, Japão), o RNA total foi extraído da porção proximal do quadríceps femoral, de acordo com as instruções do fabricante. Usando o kit de síntese de DNac de primeira cadeia, as amostras (~10 ng de RNA) foram transcritas reversamente de acordo com o protocolo do fabricante [PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) para RNAm, Takara Bio, Japão].

A enzima GAPDH foi utilizada como padrão interno para normalizar a quantidade de RNA total presente em cada reação. As condições do ciclo em tempo real foram de 95 °C por 30 segundos, seguidas de 40 ciclos a 95 °C por 5 segundos e a 60 °C por 34 segundos para o RNAm. Os níveis de expressão para cada transcrição de RNAm foram determinados normalizando cada grupo com o grupo sedentário pelo método 2- $\Delta\Delta$ CT. Os *primers* (iniciadores) usados para a detecção de DNac de rato foram concebidos por Sangon Biotech (Shanghai, China), e listados a seguir:

Beclina 1 direta: CGCAAGGTGGTGGCAGAGAAC
reversa: AAGCATGGAGCAGCAGCACTG
LC3 direta: TCGCCGACCGCTGTAAGGAG
reversa: GGTTGACCAGCAGGAAGAAGGC
PINK-1 direta: DIRETA: GCCACGGTCGCACACTGTTC
reversa: GCCATTGCCACCACGCTCTAC
GAPDH direta: AATGGTGAAGGTCGGTGTGAACG
reversa: TCGCTCTGGAAGATGGTGATGG

Análises do Western blot

Uma quantidade apropriada de quadríceps femoral misturado foi retirada e triturada. O tampão de lise RIPA com PMSF (PMSF: RIPA = 100: 1, Shanghai Biyuntian Co., China) foi adicionado às amostras. Depois de homogeneização elétrica, as amostras foram sonicadas e lisadas a 4 °C

durante a noite e, em seguida, centrifugadas a 12.000 rpm e 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi subbembalado. A amostra acima foi preparada a 20 ug/tempo, e foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida SDS (instrumento de eletroforese 325BR051391, BIO-RAD, EUA), concentração de gel de separação 12%, e a seguir, transferida para uma membrana de PVDF por 1 hora, bloqueada com leite desnatado 5%. O anticorpo primário anti-LC3 (Sangon Biotech Co., China, D155238-0100, 1:500) e a referência interna anti-GAPDH (Sangon Biotech Co., China, D110016-0100, 1:10.000) foram diluídos com 5% de leite desnatado, de acordo com a proporção das instruções para anticorpos. Em seguida, a membrana foi embebida e incubada a 4 °C em um agitador tridimensional durante a noite. A membrana foi lavada 4 vezes e o anticorpo secundário foi incubado (Sangon Biotech Co., 1:5.000) durante 1 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 avaliados na mesma membrana. O resultado final foi expresso como a razão de densidade óptica (DO) entre a proteína alvo LC3 e a referência interna de GAPDH. O software Image Lab5.1 foi usado para análise da escala de cinza.

Análise estatística

A significância estatística foi avaliada por análise de variância unilateral (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey para corrigir comparações múltiplas (SPSS 21.0, SPSS Inc.). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O nível de significância estatística foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados da qRT-PCR mostraram que, em comparação com o grupo C, o teor de RNAm em Beclina 1, PINK-1 e LC3 no grupo de exercício exaustivo imediato (E0) teve redução significativa ($p < 0,01$). No entanto, os níveis de RNAm em PINK-1 e LC3 nas células do músculo esquelético aumentaram significativamente nas 48 horas após a exaustão (E48) ($P < 0,05$). Em comparação com o grupo E0, todos os valores em E24 e E48 aumentaram significativamente ($P < 0,01$). No início, a tendência de mudança foi baixa e, a seguir passou a ser alta (Tabela 1; Figura 1).

Em comparação com o grupo C, o teor de RNAm em Beclina 1, PINK-1 e LC3 no grupo contusão imediata (D0) aumentou significativamente ($p < 0,01$) o que foi seguido por uma tendência de queda. Em comparação

Tabela 1. Expressão de genes em todos os grupos em diferentes pontos do tempo depois de exercício exaustivo (E0, E24, E48) e contusão (D0, D24, D48).

grupo (n = 6)	RNAm de Beclina 1	RNAm de PINK-1	RNAm de LC3
C	1,00 \pm 0,24	1,38 \pm 0,34	1,03 \pm 0,14
E0	0,13 \pm 0,07**	0,10 \pm 0,05**	0,12 \pm 0,04**
E24	0,92 \pm 0,20 ^{aa}	1,47 \pm 0,37 ^{aa}	1,80 \pm 0,96 ^{aa}
E48	1,98 \pm 0,4 ^{aa}	11,93 \pm 1,99 ^{aaa}	4,47 \pm 0,11 ^{***aa}
D0	5,20 \pm 0,53**	7,18 \pm 0,56**	5,83 \pm 0,79**
D24	0,14 \pm 0,10 ^{**bb}	3,93 \pm 0,37 ^{bb}	1,57 \pm 0,2 ^{1b}
D48	0,17 \pm 0,16 ^{**bb}	2,20 \pm 0,28 ^b	0,16 \pm 0,02 ^{**bb}

[*] Diferença significativa em comparação com o controle, $P < 0,05$. [**] $P < 0,01$. [a] Diferença significativa em comparação com E0, $P < 0,05$. [aa] $P < 0,01$. [b] Diferença significativa em comparação com D0, $P < 0,05$. [bb] $P < 0,01$ (n = 6/grupo).

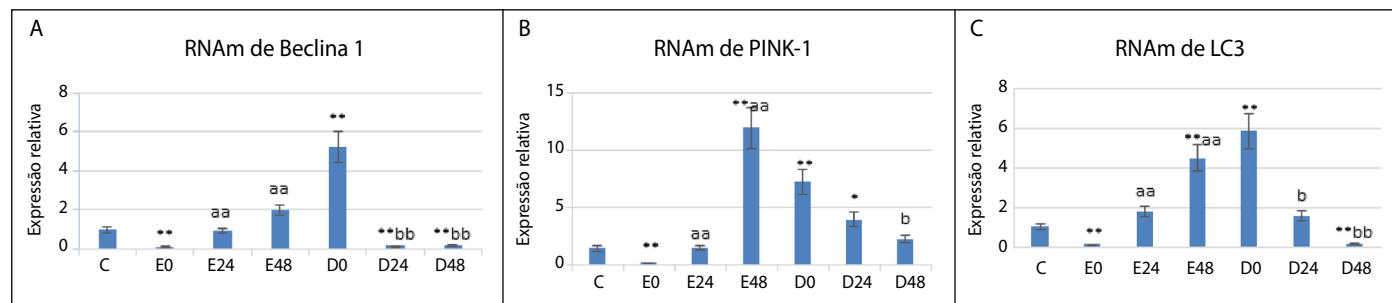


Figura 1. Expressão gênica em todos os grupos em diferentes momentos depois de exercício exaustivo (E0, E24, E48) e contusão (D0, D24, D48). As expressões gênicas foram medidas de (A) Beclina 1, (B) PINK-1, (C) LC3 por qRT-PCR. Os dados são médias \pm EPM, n = 6/grupo. [*] Diferença significativa em comparação com o controle, $P < 0,05$. [**] $P < 0,01$. [a] Diferença significativa em comparação com E0, $P < 0,05$. [aa] $P < 0,01$. [b] Diferença significativa em comparação com D0, $P < 0,05$. [bb] $P < 0,01$.

com o grupo D0, todos os valores em D24 e D48 diminuíram significativamente ($P < 0,05$). No início, a tendência de mudança foi alta depois de contusão e, a seguir passou a ser baixa. Além disso, houve diferenças em cada fase de recuperação entre contusão e modelos de exercício exaustivo (Tabela 1; Figura 1). Em comparação com o grupo D0, D24 e D48 reduziram significativamente ($P < 0,05$). Toda a tendência de mudança após a contusão contundente era inicialmente alta e depois tornou-se baixa.

Os resultados do *Western blot* de LC3 mostraram que, em comparação com o grupo C, o teor de proteína LC3 no músculo esquelético aumentou significativamente em todos os outros grupos ($P < 0,05$). Comparado com o grupo E0, o valor da proteína LC3 no grupo E48 aumentou significativamente ($P < 0,05$). Além disso, em comparação com o grupo D0, o LC3 no grupo D24 teve aumento significativo ($P < 0,01$), e a seguir passou a diminuir gradualmente (Figura 2).

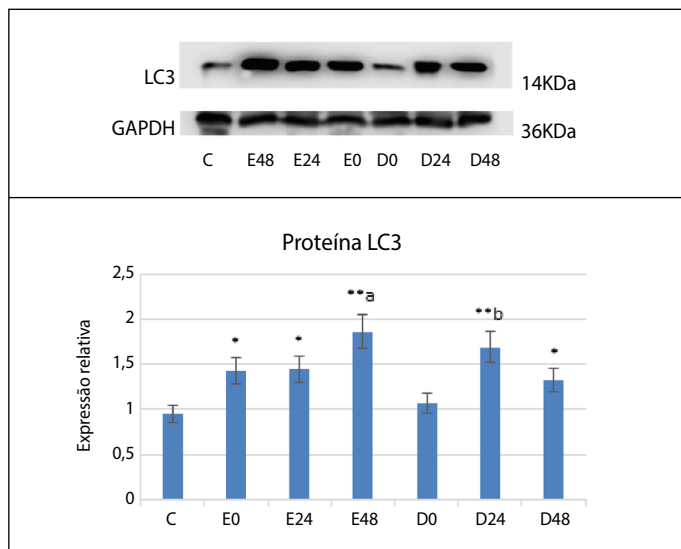


Figura 2. A expressão da proteína LC3 foi medida por Western Blot em todos os grupos em diferentes momentos depois de exercício exaustivo (E0, E24, E48) e contusão (D0, D24, D48). Dados expressos como média \pm EPM, $n = 6$ /grupo. [*] Diferença significativa em comparação com o controle, $P < 0,05$. [**] $P < 0,01$. [a] Diferença significativa em comparação com E0, $P < 0,05$. [b] Diferença significativa em comparação com D0, $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

O exercício exaustivo excêntrico pode levar a microlesões no músculo esquelético e a alterações ultraestruturais, o que foi comprovado por estudos anteriores. Também houve relatos de mudanças ultraestruturais em estudos anteriores em nosso laboratório. O trauma contuso pode causar inchaço relativamente óbvio das fibras musculares, mas as mudanças dinâmicas da autofagia nos dois modelos de lesão não são claras, fator que motivou este estudo. Por meio de comparação sincrônica, a diferença e o grau de autofagia em dois modelos serão explorados e avaliados.

Efeitos do treinamento físico sobre os fatores relacionados com a autofagia

Os relatos de investigação dos fatores relacionados com autofagia nos modelos de exercício exaustivo e contusão são raros. Os relatos anteriores mostraram que o treinamento intervalado de alta intensidade (TIAI) foi mais eficaz para melhorar o desempenho do exercício do que o treinamento contínuo de intensidade moderada (TCIM) e essa melhora é relacionada com a adaptação autofágica basal e a função mitocondrial no músculo cardíaco e esquelético. Os resultados indicaram que a expressão de Beclina 1, Bnip3, P62, ATG-3, LC3-II e razão LC3II/LC3-1 foi significativamente aumentada apenas nos músculos sóleo e cardíaco depois de TIAI.^{10,11} Em outro modelo de rato, a razão LC3II/LC3 diminuiu significativamente em uma única sessão de exercício. Porém, as alterações proteicas relacionadas com autofagia não foram encontradas no músculo gastrocnêmio branco

(glicolítico).¹² Em nosso protocolo de exercícios exaustivos graduados, o RNAm de LC3 e a expressão proteica do quadríceps femoral misturado em cada fase não foram completamente sincronizados. Depois de 48 horas do exercício exaustivo, ambos haviam crescido de modo significativo. A proteína LC3 aumentou de forma constante após a exaustão imediata, enquanto o RNAm de LC3 diminuiu imediatamente depois da exaustão e, a seguir, aumentou. Isso pode ser devido a maior consumo e dano do RNAm de LC3 imediatamente depois da exaustão.

Alguns estudos prévios investigaram as expressões dependentes do tempo de fatores relacionados à autofagia. Os resultados sugerem que uma única sessão de 50 minutos de exercício em esteira atenua a resposta autofágica no músculo esquelético murino. O marcador de autofagia LC3-II, LAMP2a, Atg7 e Beclina 1 no músculo gastrocnêmio murino diminuiu significativamente durante o período de recuperação (3, 6 e 12 horas), ao passo que não houve diminuição imediata após o exercício (0 hora).¹³ Em outro relato, os marcadores autofágicos LC3B-II do quadríceps femoral aumentaram em 120 minutos de corrida e exaustão (T-e), mas o p62 diminuiu significativamente em T-e. Os dados sugeriram que a fusão mitocondrial permaneceu inalterada, mas a fissão mitocondrial aumentou rapidamente durante o exercício.¹⁴

Em nossos modelos de rato com diferentes fases, descobrimos que o conteúdo de RNAm em Beclina 1, PINK-1 e LC3 no grupo de exercício exaustivo imediato (E0) foi significativamente reduzido em comparação com o grupo C, indicando que o nível de autofagia celular não estava alto na fase de recuperação inicial do exercício exaustivo. Mas os níveis de RNAm em PINK-1, LC3 e LC3 no quadríceps femoral aumentaram significativamente nas 48 horas após a exaustão (E48), sugerindo que a autofagia celular tendeu a aumentar durante o período de recuperação.

Por outro lado, foi confirmado que o pré-condicionamento físico tardio (PFT) tem efeito protetor sobre o estresse cardiovascular agudo.¹⁵ O PFT causou degradação mitocondrial mediada por parkina e suprimiu significativamente as lesões de exaustão induzidas pelo exercício, aumentando a eficiência da translocação da membrana mitocondrial externa de LC3. Bnip3 pode desempenhar um papel na indução de aumentos de LC3-II mitocondrial.¹⁶ Em um estudo anterior,¹⁷ oito homens participaram de exercícios de ultraresistência em uma corrida de 200 km. Os níveis de transcrição dos genes LC3b, BNIP3, ATG4b e ATG12 relacionados com a autofagia no músculo esquelético humano aumentaram acentuadamente, o que ativou a autofagia. Os outros relatos indicaram que os eventos regulatórios da autofagia foram atenuados no músculo esquelético envelhecido. Contudo, o nível de autofagia pode ser regulado positivamente por algum treinamento físico.^{18,19}

Efeitos de doenças e lesões musculares sobre fatores relacionados com autofagia

Os relatos de investigação de fatores relacionados com a autofagia em modelos de contusão também são raros. Um estudo recente mostrou que os marcadores de fissão mitocondrial foram elevados, enquanto as proteínas de fusão foram reduzidas depois de transecção do nervo ciático.²⁰ Houve elevações na expressão total dos marcadores de mitofagia Beclina 1, PINK-1, LC3-II, p62 e ULK1 fosforilada (Serina 555). Como resultado, a paralisia do músculo gastrocnêmio provoca a elevação progressiva da expressão de proteínas mitofágicas e fissão mitocondrial. As intervenções de reabilitação ou farmacêuticas para limitar o excesso de mitofagia podem ser terapias eficazes para proteger a função e a massa muscular paralisada.

A atrofia muscular induzida por doença renal crônica (DRC)²¹ foi associada à autofagia e mitofagia ativadas acompanhadas por elevação de proteínas e expressão de RNAm de PINK-1, BNIP3, LC3, p62 e parkina no músculo esquelético e mitocôndrias isoladamente. A autofagia pode ser ativada por fatores translacionais FoxO3 no músculo esquelético, o que pode ser uma nova forma de intervenção na atrofia muscular por DRC.²² Além disso, o exercício aeróbico regular pode influenciar

efetivamente diversos fatores relacionados com autofagia no músculo esquelético de ratos hipertensos e normotensos.²³

Sobre o reparo de contusão aguda do músculo esquelético,²⁴ o relato indicou que as expressões de P62 e LC3-II foram altas no início e reduzidas posteriormente. Comparado com o grupo controle e o grupo de 14 d, a expressão de LC3-II e P62 aumentou significativamente depois de contusão aguda do músculo esquelético em 3 d, 5 d, 7 d. Isso mostrou que a taxa de recuperação da lesão pode estar relacionada com o nível de autofagia.

Nosso modelo de contusão não foi semelhante aos estudos anteriores quanto às fases de recuperação. Constatamos que o conteúdo de RNAm em Beclina 1, PINK-1 e LC3 no grupo de contusão imediata (D0) aumentou significativamente com relação ao grupo C, indicando que o nível de autofagia celular teve aumento considerável nas fases de recuperação imediata e inicial depois de contusão, seguida por tendência decrescente. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo comparativo que investiga os fatores relacionados com autofagia por meio de dois modelos de exercício exaustivo único e contusão. Em conclusão, nossos modelos de rato mostraram diferenças em cada fase de recuperação entre contusão e modelos de exercício exaustivo. As lesões contusas foram mais graves do que as lesões por exercício exaustivo, de modo que a autofagia teve início precoce de acordo com as alterações dos fatores relacionados com autofagia. O RNAm de LC3 aumentou significativamente logo depois de lesão contusa, mas houve defasagem no aumento expressivo da proteína LC3 24 horas depois da exaustão; a seguir, ambos diminuíram.

Via de sinalização de PINK-1/parkina e mitofagia

No mecanismo regulatório da mitofagia, o acúmulo de PINK-1 na membrana externa pode recrutar e fosforilar a parkina para se localizar na mitocôndria, o que fortalece a atividade da ubiquitina ligase E3. A parkina pode causar acúmulo de P62 nas proteínas da matriz mitocondrial e ligar LC3, favorecendo que a mitocôndria alvo entre em autofagossomos e inicie a autofagia mitocondrial.^{25,26}

Os modelos atuais de autofagia seletiva indicam que os receptores de autofagia, inclusive NDP52 e Optineurina, podem ligar a carga autofágica às membranas autofagossômicas.³ O motivo da região de interação LC3 (LIR) no interior dos receptores autofágicos é amplamente reconhecido como essencial para o sequestro seletivo de carga. Acredita-se que isso ocorra por meio da ligação do receptor de autofagia a homólogos da Atg8 (LC3/GABARAP) por meio de uma região de interação de LC3 (LIR). Aqui, o motivo LIR dentro de NDP52 e optineurina é dispensável para a seletividade Atg8 e recrutamento durante a mitofagia PINK-1/parkina.

Em geral, organelas danificadas e agregados de proteínas são marcados com cadeias de ubiquitina para desencadear a autofagia.²⁷ Para ativar a ubiquitina ligase parkina, a ubiquitina quinase PINK-1 fosforila a ubiquitina para iniciar a mitofagia, que constrói cadeias de ubiquitina nas proteínas da membrana mitocondrial externa e recruta os receptores autofágicos. Em nossos modelos de rato, as alterações de RNAm em PINK-1, Beclina 1 e LC3 foram basicamente semelhantes. Além disso, o mecanismo regulatório da via de sinalização PINK-1/parkina durante a lesão e regeneração muscular em nossos dois modelos precisa ser investigado no futuro.

CONCLUSÕES

No geral, foram identificadas diferenças em cada fase de recuperação entre modelos de contusão e de exercício exaustivo. A expressão dos genes dos fatores relacionados com a autofagia, Beclina 1, PINK-1 e LC3, não foi elevada na fase de recuperação inicial de exercício exaustivo e foi seguida por tendência ascendente. Contudo, os fatores acima aumentaram significativamente nas fases de recuperação imediata e inicial depois de contusão. A contusão pode ser mais grave do que a lesão por exercício exaustivo, portanto, a autofagia começa mais cedo, de acordo com as mudanças dos fatores relacionados à autofagia.

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

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES: Cada autor contribuiu individual e significativamente para o desenvolvimento deste artigo. TP e MJ conceberam e desenvolveram os experimentos. TP e MJ realizaram os experimentos. MJ analisou os dados. JJ, FY, CQ e TY contribuíram com reagentes, materiais e ferramentas de análise. Tongbin Pan foi responsável pela redação do artigo. Todos os autores revisaram e aprovaram a versão final do artigo.

REFERÊNCIAS

1. Russ DW, Garvey SM, Densmore C, Hawks T, Hermans S, Pardia K. Effect of acute muscle contusion injury, with and without dietary fish oil, on adult and aged male rats: contractile and biochemical responses. *Exp Gerontol*. 2018;111:241-52.
2. Vainshtein A, Tryon LD, Pauly M, Hood DA. Role of PGC-1 α during acute exercise-induced autophagy and mitophagy in skeletal muscle. *Amer J Physiol Cell Physiol*. 2015;308(9):710-9.
3. Baechler BL, Bloemberg D, Quadrilatero J. Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation. *Autophagy*. 2019;15(9):1606-19.
4. Karim MR, Kawanago H, Kadowaki M. A quick signal of starvation induced autophagy: Transcription versus post-translational modification of LC3. *Anal Biochem*. 2014;465:28-34.
5. Padman BS, Nguyen TN, Uoselis L, Skulsuppaisarn M, Nguyen LK, Lazarou M, et al. LC3/GABARAPs drive ubiquitin-independent recruitment of Optineurin and NDP52 to amplify mitophagy. *Nat Commun*. 2019;10:408.
6. Fava LL, Rainer J, Haschka MD, Geley S, Villunger A. Beclin 1 is dispensable for chromosome congression and proper outer kinetochore assembly. *EMBO Rep*. 2015;16(10):1233-6.
7. Pickrell AM, Youle RJ. The role of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*. 2015;85(2):257-73.
8. 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;95:67-75.
9. Kami K, Masuhara M, Kashiwa 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.
10. Li FH, Li T, Su YM, Ai JY, Duan R, Liu TCY, et al. Cardiac basal autophagic activity and increased exercise capacity. *J Physiol Sci*. 2018;68(6):729-42.
11. 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.
12. Zhang DD, Lee JH, Kwak SE, Shin HE, Zhang YJ, Moon HY, et al. Effect of a single bout of exercise on autophagy regulation in skeletal muscle of high-fat high-sucrose diet-fed mice. *J Obes Metab Syndr*. 2019;28(3):175-85.
13. Kim YA, Kim YS, Song W. Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle. *J Physiol Biochem*. 2012;68(2):229-35.
14. Pagano AF, Py G, Bernardi H, Candau RB, Sanchez AMJ. Autophagy and Protein Turnover Signaling in Slow-Twitch Muscle during Exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2014;46(7):1314-25.
15. Yuan Y, Pan SS. Parkin mediates mitophagy to participate in cardioprotection induced by late exercise preconditioning but Bnip3 does not. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2018;71(5):303-16.
16. Yuan Y, Pan SS, Wan DF, Lu J, Huang Y. H2O2 Signaling-Triggered PI3K Mediates Mitochondrial Protection to Participate in Early Cardioprotection by Exercise Preconditioning. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;1916841.
17. Jamart C, Benoit N, Raymackers JM, Kim HJ, Kim CK, Francaux M. Autophagy-related and autophagy-regulatory genes are induced in human muscle after ultraendurance exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2012;112(8):3173-7.
18. Mejias-Pena Y, Rodríguez-Miguel P, Fernandez-Gonzalo R, Martinez-Florez S, Almar M, Paz JA, et al. Effects of aerobic training on markers of autophagy in the elderly. 2016;38(2):33.
19. 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.
20. 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.
21. Zhang YY, Gu L, Huang J, Cai MC, Yu HL, Zhang W, et al. CKD autophagy activation and skeletal muscle atrophy: a preliminary study of mitophagy and inflammation. *Eur J Clin Nutr*. 2019;73(6):950-60.
22. Su Z, Klein JD, Du J, Franch HA, Zhang LP, Hassounah F, et al. Chronic kidney disease induces autophagy leading to dysfunction of mitochondria in skeletal muscle. *Amer J Physiol-Renal Physiol*. 2017;312(6):F1128-40.
23. McMillan EM, Pare MF, Baechler BL, Graham DA, Rush JWE, Quadrilatero J, et al. 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.
24. Luo A, Tang CL, Huang SQ, Zhao DD, Zhang AN, Guo QH, et al. Changes in expression of autophagy-related factors during acute contusion repair of skeletal muscle. *Chinese J Appl Physiol*. 2018;34(2):97-101.
25. Thomas MD, Edward AF. The three P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. *Genes & Dev*. 2015;29(10):989-99.
26. Burman JL, Pickles S, Wang C, Sekine S, Vargas JNS, Zhang Z, et al. Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. *J Cell Biol*. 2017;216(10):3231-47.
27. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang CX, Burman JL, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*. 2015;524(7565):309-14.