

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
REABILITAÇÃO**

**DANNYLO WESLEY NÓBREGA DE SOUSA**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES  
DO SISTEMA CALICREÍNA-CININAS EM DEPÓSITOS  
ADIPOSOS EM SUJEITOS COM SÍNDROME DE CUSHING**

**São Paulo, SP**

**2011**

**DANNYLO WESLEY NÓBREGA DE SOUSA**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES  
DO SISTEMA CALICREÍNA-CININAS EM DEPÓSITOS  
ADIPOSOS EM SUJEITOS COM SÍNDROME DE CUSHING**

Dissertação apresentada à Universidade  
Nove de Julho para obtenção do título de  
Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Andrey Jorge Serra

**São Paulo, SP**

**2011**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Sousa, Dannylo Wesley Nóbrega de

Análise da expressão de componentes do sistema caliceína-cininas em depósitos adiposos em sujeitos com síndrome de Cushing./ Dannylo Wesley Nobrega de Sousa. 2011.

61 folhas.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho – UNINOVE -Ciências da Reabilitação, São Paulo, 2011.

Orientador (a): Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior

1. Cininas. 2. Síndrome de Cushing. 3. Expressão Gênica. 4. Tecido Adiposo
- I. Silva Júnior, José Antônio

CDU 615.8

São Paulo, 12 de dezembro de 2011.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

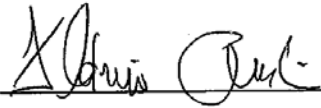
Aluno: DANNYLO WESLEY NÓBREGA DE SOUSA

Título da Dissertação: "ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DO SISTEMA CALICREÍNA-CININAS EM DEPÓSITOS ADIPOSOS EM SUJEITOS COM SÍNDROME DE CUSHING"

Presidente PROF. DR. JOSE ANTONIO SILVA JUNIOR



Membro: PROF. DR FLAVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO



Membro: PROFA. DRA. REGIANE ALBERTINI DE CARVALHO



## DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar a Deus, por ter iluminado meus caminhos, proporcionado saúde e conhecimento para a concretização dos meus objetivos.

A minha família que confiou no meu potencial e investiu com amor nos meus sonhos, sacrificando às vezes vontades maiores. Por terem oferecido uma educação pautada no respeito e humildade, valores que me fizeram chegar até aqui.

A minha eterna companheira Viviane que com amor compreendeu os momentos difíceis me acalentando com palavras de incentivo e festejou com muita alegria os momentos mais felizes dessa empreitada.

*Gosto de ser gente porque, inacabado, sei que sou um ser condicionado mas, consciente do inacabamento, sei que posso ir mais além dele. Está é a diferença profunda entre o ser condicionado e o ser determinado.*

*Paulo Freire*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. José da Silva que acreditou no meu potencial e gentilmente me convidou para ser seu aluno, por ter sido um grande pai, sempre compreendendo as minhas dificuldades e me ensinado a ser melhor como homem.

Ao Prof. Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento que ao me escolher entre tantos alunos de iniciação científica abriu as portas do mundo maravilhoso da pesquisa, me ensinando não apenas técnicas laboratoriais, mas me ajudando a ser alguém tão singular no caráter, na amizade e alegria como ele.

A grande companheira Osneri Jacobsen, sempre de bem com todos, me ensinou muito sobre a vida e confiou na minha ajuda para a realização de diversos feitos em anos de intensas atividades.

Aos queridos professores Dr. Andrey Serra, Dr. Carlos Alberto da Silva, Dra. Raquel Mesquita, Dra Sandra Kalil, Dra Kristianne Porta, Dra. Carla Malaguti e Dra. Simone dal Corso , por terem me recebido sempre de braços abertos com um sorriso no rosto demonstrando sempre um grande carinho por mim, creditando a mim a capacidade de realização desse trabalho

Aos amigos do mestrado Paola Pelegrineli, Soraia Micaela, Martha Manchini, Fernando Carlos, Marcelo, Thiago, Eduardo Santana, Raphael Boiati e Moisés por toda cumplicidade e ajuda no desenvolvimento deste projeto.

Aos companheiros de iniciação científica Ana Karen, Jorge Gabriel, Sheila Cristina e Bruno Duzzi por todo empenho e amizade desenvolvidos nestes anos.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UNIFESP: Paulo Tucci, Danilo Bocalini, Ednei Antonio, por terem me recebido de braços abertos e terem compartilhado muito conhecimento.

Aos companheiros técnicos da UNINOVE, pela compreensão e força dada em todos os momentos, pelas palavras de incentivo que me ajudaram a ser mais confiante. Ao apoio especial prestado pelos grandes amigos Sarah Siebra e Alexandre Batista para conclusão deste estudo.

A UNINOVE pela oportunidade ofertada, pois sem esta ajuda, não seria possível a conclusão deste curso.

## RESUMO

Os glicocorticóides (GC) têm um papel importante na determinação da distribuição de tecido adiposo e do metabolismo. Indivíduos com Síndrome de Cushing (SC) apresentam um padrão de obesidade central, relacionado a níveis excessivos de glicocorticóides plasmáticos de origem endógena ou exógena que é reversível após o tratamento ou a retirada dos corticóides. Os mecanismos envolvidos na distribuição do tecido adiposo mediada pelos glicocorticóides não estão completamente compreendidos. O objetivo deste estudo foi quantificar e avaliar os efeitos da exposição crônica ao hipercortisolismo na expressão gênica de componentes do sistema caliceína-cinina em depósitos adiposos de pacientes com síndrome de Cushing. As amostras de tecido adiposo visceral (VAT) e de tecido subcutâneo (SAT) foram obtidas durante a cirurgia abdominal eletiva de pacientes do sexo feminino com síndrome de Cushing (n =9), nos quais o índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal (CA) e cortisol salivar (CTS) foram previamente determinados. A expressão do mRNA de caliceína tecidual e dos receptor B1 e B2 de cininas foram quantificados por PCR em tempo real. A expressão do mRNA do receptor B2 de cininas no SAT e VAT de pacientes com Cushing não foi diferente nos dois compartimentos ( $p > 0,05$ ). A expressão do receptor B1 de cininas mostrou-se diminuída em SAT quando comparada com VAT de pacientes com Cushing ( $p < 0,01$ ). A expressão de caliceína tecidual apresentou um aumento significativo em VAT de pacientes com Cushing ( $p < 0,05$ ). Nossos dados sugerem que o hipercortisolismo crônico, como visto na síndrome de Cushing, está relacionado a um aumento da expressão de mRNA de receptores B1 de cininas e de caliceína tecidual em tecido adiposo visceral (VAT), o principal compartimento responsável por complicações relacionadas com a obesidade e alta mortalidade, enquanto que a expressão gênica do receptor B2 de cininas permaneceu inalterada nos dois compartimentos.

**Palavras-chave:** Cininas; Síndrome de Cushing; Expressão Gênica; Tecido Adiposo.



## ABSTRACT

Glucocorticoids (GC) play an important role in determining the distribution of adipose tissue and metabolism. Individuals with Cushing's syndrome (CS) show a pattern of central obesity, related to excessive levels of plasma glucocorticoids exogenous or endogenous origin which is reversible after treatment or withdrawal of corticosteroids. The mechanisms involved in the distribution of adipose tissue mediated by glucocorticoids are not fully understood. The objective of this study was to quantify and evaluate the effects of chronic exposure to hypercortisolism in the gene expression of components of the kallikrein-kinin fat deposits in patients with Cushing's Syndrome. Samples of visceral (VAT) and subcutaneous adipose tissue (SAT) were obtained during elective abdominal surgery for female patients with Cushing's Syndrome (n = 9), in which the body mass index (BMI), waist circumference (WC) and salivary cortisol (CTS) were previously determined. The mRNA expression of tissue kallikrein and the kinin B1 and B2 receptors were quantified by real-time PCR. The mRNA expression of kinin B2 receptor in SAT and VAT of Cushing's patients was similar in both compartments ( $p > 0.05$ ). The expression of kinin B1 receptor was reduced in SAT when compared to VAT of patients with Cushing ( $p < 0.01$ ). The expression of tissue kallikrein showed a significant increase in VAT than observed in SAT of patients with Cushing's Syndrome ( $p < 0.05$ ). Our data suggest that chronic hypercortisolism, as seen in Cushing's Syndrome, is related to an increased mRNA expression of kinin B1 receptor and tissue kallikrein in visceral adipose tissue (VAT), the main compartment responsible for complications related to obesity and high mortality, while the gene expression of kinin B2 receptor remained unchanged in both compartments.

**Keywords:** Kinin; Cushing's Syndrome; Gene Expression; Adipose Tissue.

## SUMÁRIO

<b>1.Contextualização</b> .....	13
1.1 Síndrome de Cushing.....	13
1.2 Glicocorticóides.....	14
1.3 SistemaCalicreína-Cininas (SCC).....	15
<b>2. Objetivo</b> .....	17
2.1 Principal.....	17
2.2 Secundário.....	17
<b>3. Material e Métodos</b> .....	18
3.1 Delineamento do estudo: Caso e controle.....	18
3.2 Participantes.....	18
3.2.1 Critérios de inclusão.....	18
3.2.2 Critérios de exclusão.....	18
3.3 Local.....	18
3.4 Método de coleta.....	19
3.5 Análises da expressão gênica.....	19
3.6 Análise Estatística.....	21
<b>4. Resultados</b> .....	22
Artigo 1 <i>“Pilot study of gene expression analysis of kinin B1 and B2 receptors in adipose tissue depots in Cushing’s syndrome subjects”</i> .	
<b>5. Dados adicionais</b> .....	38
<b>6. Considerações Finais</b> .....	39
<b>7. Conclusão</b> .....	42
<b>8. Referências Bibliográficas (Contextualização e Considerações finais)</b> .....	43
<b>9. Apêndice</b> .....	48
Artigo2 <i>“Atividade Física Intensa: Papel do Óxido Nítrico na Apoptose”</i> submetido e aceito na revista Terapia Manual.	

## LISTA DE FIGURAS

### Contextualização

**Figura 1.** Classificação da Síndrome de Cushing.....13

**Figura 2.**O Sistema Calicreína-Cininas.....16

### **Artigo “*Pilot study of gene expression analysis of kinin B1 and B2 receptors in adipose tissue depots of Cushing’s syndrome subjects*”**

**Figure 1.**Hydrolysis representation of kallikrein-kinins system.....35

**Figure 2.**Quantification of kinin B1 receptor gene expression in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues.....36

**Figure 3.**Quantification of kinin B2 receptor gene expression in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues.....37

### Dados Adicionais

**Figure 4.** Quantificação da expressão gênica de calicreína tecidual em tecido adiposo subcutâneo (SAT) e visceral (VAT) em pacientes com Síndrome de Cushing.....38

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACE - Angiotensin-Converting Enzyme  
ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico  
BK –Bradicina  
BMI - Índice de Massa Corporal  
CA - Circunferência Abdominal  
CPM - Carboxipeptidase M  
CTS - Cortisol salivar  
Dye - Substância Fluorescente  
ECA - Enzima Conversora de Angiotensina  
ERO - Espécie Reativa de Oxigênio  
GC - Glicocorticóides  
GH – Growth Hormone  
GR – Glucocorticoid Receptor  
HGG - Hospital Geral de Goiânia  
IMC – Índice de Massa Corporal  
LDL - Low Density Lipoproteins  
LPL - Lipoprotein lipase  
LPS – Lipopolissacarídeo de E. coli  
mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro  
MS – Metabolic Syndrome  
NO - Óxido Nítrico  
NOS - Óxido Nítrico Sintase  
PCR - Polymerase Chain Reaction  
RIA - Radioimmunoassay  
RT-PCR - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction  
SAT - Tecido Adiposo Subcutâneo  
SC- Síndrome de Cushing

SCC - Sistema Calicreína-Cininas

SOD - Enzima Superóxido-Dismutase

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TRAIL - *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

UNINOVE - Universidade Nove de Julho

VAT - Tecido Adiposo Visceral

VLDL - Very-Low-Density Lipoprotein

WC - Circunferência Abdominal

## 1. Contextualização

### 1.1 Síndrome de Cushing

A síndrome de Cushing (SC) foi descrita primeiramente em 1921 após análises do médico e neurocirurgião norte-americano Harvey Cushing. A Síndrome de Cushing decorre de um complexo de sintomas e sinais associados à exposição prolongada às quantidades excessivas de glicocorticóides livres plasmáticos (1). As principais causas da Síndrome de Cushing estão relacionadas a duas formas, exógena ou iatrogênica e endógena, definidas respectivamente pela administração crônica medicamentosa ou hiperprodução de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (1,2).

A produção excessiva de glicocorticoides pelo córtex da adrenal não está relacionada com o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) em 15 a 20 % dos casos, sendo dependente nos casos restantes (3). A síndrome de Cushing ACTH-independente relaciona-se com casos de tumores adrenais benignos ou malignos ou também por hiperplasia adrenal bilateral. A SC dependente de ACTH tem sua causa relacionada principalmente a tumores hipofisários corticotróficos, produtores de ACTH, definindo tal síndrome. Contudo, raramente pode ser causada por produção ectópica de ACTH ou por tumores secretores de CRH (3).

---

#### **ACTH dependente**

- Tumor pituitário (Doença de Cushing)
- Secreção ectópica de ACTH e ou CRH

#### **ACTH independente**

- Tumor adrenal – adenoma ou carcinoma
- Hiperplasia adrenal bilateral

---

**Figura 1.** Classificação da Síndrome de Cushing

Pacientes portadores da síndrome de Cushing (SC), independentemente de sua etiologia, possuem adipogênese anormal e desenvolvem obesidade de distribuição central com adelgaçamento de tecido subcutâneo, estrias cutâneas violáceas, giba de búfalo, “face de lua cheia”, pletora facial, fraqueza muscular proximal, extremidades finas com hipotrofia muscular, fragilidade capilar, acne, hirsutismo e irregularidade menstrual (1, 2). Algumas alterações são reversíveis após tratamento ou suspensão do glicocorticóide quando se trata da SC exógena (4, 5). Sabe-se que atualmente a SC está relacionada com hipertensão em mais de 90% dos casos, obesidade visceral em mais de 80% e osteoporose em 50% dos casos (6) além de gama de outros sinais e sintomas (7).

## **1.2 Glicocorticóides**

Os glicocorticóides são conhecidos pelos efeitos sobre o metabolismo dos carboidratos; contudo, além dessa propriedade, há outras que são mediadas por receptores intracelulares de glicocorticóide, sendo que algumas delas são mediadas por receptores mineralocorticóides (8, 9, 10). A SC iatrogênica é dada pela utilização prolongada de corticosteróides. A grande diferença entre o hipercortisolismo exógeno e endógeno constitui-se na maior ação mineralocorticóide existente neste último, resultando em mais manifestações de hipertensão arterial, ocasionalmente, hipocalcemia e hirsutismo e/ou virilização, principalmente quando secundário a tumores adrenais. Alguns efeitos menos comuns como, por exemplo, hipertensão intracraniana benigna, necrose avascular óssea e glaucoma, teriam maior relação com a SC exógena do que com a SC endógena (11).

No uso crônico de corticosteróides a distribuição diferenciada da gordura é quase que constante, tendo como resultado uma redução em extremidades e um acúmulo centripetamente. Tais alterações podem ocorrer devido à perda de tecido celular subcutâneo de modo dissociado (12). Há uma alteração lipídica na SC que se baseia na elevação de lipoproteínas de baixa densidade (VLDL e LDL), tendo como consequência um incremento dos níveis séricos de colesterol e triglicérides;

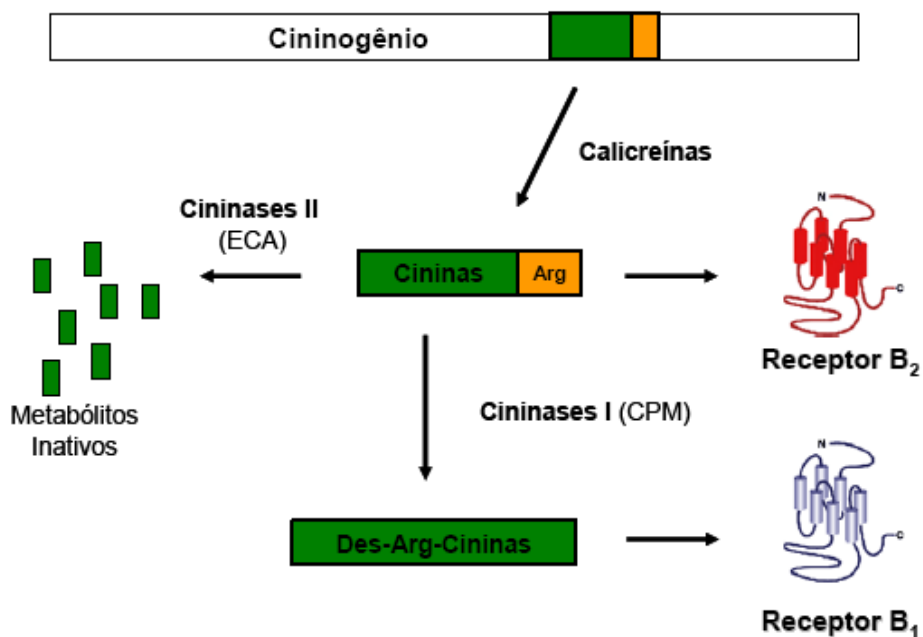
provavelmente devido a influencia na síntese do VLDL, produção de ácidos graxos e atividade da lípase endotelial hepática (13).

Os efeitos colaterais da administração de corticosteróide são heterogêneos entre os indivíduos de uma população; isso devido provavelmente, a cinética ou as diferentes concentrações plasmáticas das proteínas carreadoras desses fármacos (11). Esquemas terapêuticos têm sido propostos com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios advindos de seu uso crônico, sendo umas das técnicas o seu emprego em dias alternados que praticamente não influi sobre o eixo hipotálamo hipófise-adrenal e a velocidade de crescimento das crianças. (12, 14,15).

### **1.3 Sistema Calicreína-Cininas (SCC)**

O Sistema Calicreína-Cininas é um sistema envolvido em processos de transmissão de dor, no controle da pressão arterial, no processo de geração e manutenção do estado inflamatório (16, 17, 18). Adicional a esses processos, o SCC tem um importante papel na captação de glicose (19). O Sistema Calicreína-Cininas é composto por: substratos protéicos precursores, denominados cininogênios, enzimas que hidrolisam estes substratos, denominadas calicreínas; cininas que são produtos da ação das calicreínas sobre os cininogênios; receptores distintos de cininas, caracterizados farmacológica e molecularmente, denominados B1 e B2; e as cininases, enzimas que degradam as cininas liberando os agonistas do receptor B1 ou peptídeos inativos (Figura 2).





**Figura 2.O Sistema Calicreína-Cininas.** ECA, enzima conversora de angiotensina; CPM, carboxipeptidase M. Arg, arginina.Mori et al, 2007.

As funções fisiológicas atribuídas ao receptor B1 ainda são pouco conhecidas. Vários estudos dão importância à participação do receptor B1 em processos inflamatórios. O aparecimento deste receptor após o tratamento com lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) (20) e a ativação do NF- $\kappa$ B pelo agonista do receptor B1 (21) sugerem um papel para este receptor na inflamação.

## **2. Objetivo**

**2.1 Principal:** Identificar se há maior expressão dos componentes do Sistema Caliceína-Cininas em tecido adiposo subcutâneo e visceral de pacientes com Síndrome de Cushing endógena ajustados para mesmo índice de massa corporal (IMC) e idade.

**2.2 Secundário:** Verificar se há diferença de expressão dos receptores de cininas B1 e B2 e da caliceína tecidual em dois diferentes compartimentos –tecido subcutâneo e visceral - de indivíduos com SC endógena.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Delineamento do estudo: Caso e controle**

A amostra foi composta por tecido adiposo de nove (9) indivíduos com hipercortisolismo endógeno submetidos à cirurgia abdominal eletiva.

#### **3.2 Participantes**

##### **3.2.1 Critérios de inclusão**

- Pacientes do sexo feminino com Síndrome de Cushing endógena.
- Síndrome de Cushing (SC) endógena foi definida pelos procedimentos habituais como falta de supressão do cortisol basal (salivar ou plasmático) após 1mg de Dexametasona para valores inferiores a 1,8 mg/ml e/ou três (3) amostras de cortisol urinário livre com valores 3 vezes acima do limite superior do método.

##### **3.2.2 Critérios de exclusão**

- Pacientes do sexo masculino, presença de comorbidades como diabetes, uso de corticóide, metiformina, tiazolinedionas e anorexígenos.

#### **3.3 Local**

As amostras teciduais foram obtidas de pacientes com SC endógeno referido eletivamente para cirurgia por laparotomia aberta ou videolaparoscopia na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Hospital Geral de Goiânia (HGG), Hospital do Servidor Público Estadual do Estado de São Paulo, Hospital do

Brigadeiro e Hospital da Beneficência Portuguesa. As amostras foram processadas no laboratório de Biologia Molecular da UNINOVE.

### **3.4 Método de coleta**

Na noite anterior à cirurgia eletiva, a paciente foi entrevistada para preenchimento de protocolo com dados de identificação e antropométricos. Dados sobre valores de exames laboratoriais diagnósticos, exames radiológicos, comorbidades e drogas em uso foram extraídos do prontuário médico. Às 23 h do dia que antecede a cirurgia foi colhida amostra de cortisol salivar. Durante o ato cirúrgico, após anestesia geral, foram extraídas amostras de tecido adiposo de aproximadamente 2 g ao nível da cicatriz umbilical ou infra-costal (tecido adiposo subcutâneo, SAT) e gordura omental (tecido adiposo visceral, VAT). As amostras foram armazenadas em gelo seco e estocadas a  $-70^{\circ}$  C.

### **3.5 Análises da expressão gênica**

Para a quantificação do mRNA dos receptores de cininas B1 e B2 e da calcitreína tecidual, utilizamos Reação em Cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction” - PCR) em tempo real usando termociclador em tempo real (ABI 7700, AppliedBiosystems). Foi utilizado o método (SYBR Green) que detecta a ligação de uma substância fluorescente (“dye”) ao DNA. Enquanto não ligada ao DNA, o “dye” exibe pequena fluorescência na solução, mas durante a fase de alongamento crescentes montantes da substância se ligam ao DNA nascente distendido. Durante o passo de polimerização, mais e mais moléculas de “dye” se

ligam ao DNA recém sintetizado e o aumento da fluorescência pode ser monitorado em Tempo Real.

Os oligonucleotídeos comerciais utilizados para as reações de PCR foram:

B1 (acesso nº NM\_030851, GenBank) senso: 5'-CCAGGGTTCGTCATCACTATCTG-3' e antisenso 5'-GCAAAAGGAAGAAGGACAAGACTAA-3'; B2 (acesso nº NM\_173100.1, GenBank) senso: 5'-CCCTTCCTCTGGGTCCTCTT-3' e antisenso 5'-CAGAACACGCTGAGGACAAAGA-3'; pré-caliceína tecidual (KLK1, (acesso nº NM\_001005382, GenBank) senso: 5'-CCTGATCCTATTCCTCGACCTGTCCCTG-3' e antisenso: 5'-GTAGATGGCTGGCATGTTGGTTTTGG-3'. Como controles internos foram utilizados o gene da desidrogenase de gliceraldeído-fosfato (GAPDH, acesso nº NM 017008, GenBank) senso: 5'-TGCAACCACTGCTTAGC -3' e antisenso: 5'-GCCCCACGGCCATCA -3', e o gene da beta-2 microglobulina (BMG, acesso nº AF072097, GenBank<sup>TM</sup>) senso 5'-TGTCTTTCAGCAAGGACTGG-3' e antisenso 5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3'. Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen e testados em estudos recentes (Bortone e cols., 2008). A detecção de fluorescência se dá automaticamente pelos filtros do aparelho, e é imediatamente transferida para o software de análise. Os experimentos foram realizados em duplicata. Como controles de especificidade de reação foram utilizados dois parâmetros: presença de apenas um pico de fluorescência no protocolo de dissociação; e ausência de qualquer tipo de amplificação nas reações com os controles negativos de transcrição reversa.

### **3.6 Análise Estatística**

Os dados serão analisados pelo teste de variância ANOVA e teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer *post hoc* para determinar diferenças entre grupos. Um valor de  $p < 0,05$  será considerado como representativo de uma diferença significativa.

## 4. Resultados

O artigo “*Pilot study of gene expression. Analysis of kinin B1 and B2 receptors in adipose tissue depots of Cushing’s syndrome subjects*” foi aceito para publicação na revista *Conscientiae Saúde* em 2011.

***Pilot study of gene expression analysis of kinin B1 and B2 receptors in adipose tissue depots of Cushing's syndrome subjects.***

Estudo piloto da análise da expressão gênica de receptores de cininas em depósitos adiposos de sujeitos com Síndrome de Cushing.

Dannylo Wesley Nóbrega de Sousa<sup>1</sup>, Kalil Jacinto Ribeiro<sup>1</sup>, Eduardo Tadeu Santana<sup>1</sup>, Daniela Antunes-Espindola<sup>2</sup>, PhD, Claudio Kater<sup>2</sup>, PhD e José Antonio Silva Júnior<sup>1\*</sup>, PhD.

<sup>1</sup>Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Rua Vergueiro, 235 - Liberdade 01504-001 São Paulo, SP – Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Rua Pedro de Toledo 781, 13º andar 04062-023 São Paulo, SP – Brasil

*Running Title: Kinin expression in adipose depots in Cushing's syndrome.*

Título abreviado: Expressão de cininas em depósito adiposo em Síndrome de Cushing.

\*Corresponding author: José Antonio Silva Junior, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Rua Vergueiro, 235 - Liberdade 01504-001 São Paulo, SP – Brasil Fone:+55 1133859222. josejr@uninove.br



***Pilot study of gene expression analysis of kinin B1 and B2 receptors in adipose tissue depots in Cushing's syndrome subjects.***

Estudo piloto da análise da expressão gênica de receptores de cininas em depósitos adiposos de sujeitos com Síndrome de Cushing.

*Running Title: Kinin expression in adipose depots in Cushing's syndrome.*

Título abreviado: Expressão de cininas em depósito adiposo em Síndrome de Cushing.

**Abstract**

**Introduction:** Glucocorticoids (GC) play an important role in determining the distribution of adipose tissue and metabolism. Individuals with endogenous or exogenous hypercortisolism develop a pattern of central obesity, which is reversible after treatment or withdrawal of glucocorticoids. The mechanisms involved in the distribution of adipose tissue mediated by glucocorticoids are not fully understood. The objective of this study was to quantify and evaluate the effects of chronic exposure to hypercortisolism on kinin B1 and B2 receptors expression in subcutaneous and visceral fat deposition in patients with Cushing's syndrome. **Method:** Samples of subcutaneous adipose tissue (SAT) and visceral adipose tissue (VAT) were obtained during elective abdominal surgery in female patients with Cushing's syndrome (n = 5), in which the body mass index (BMI), waist circumference (WC) and salivary cortisol (SC) were determined. The mRNA expression of B1 and B2 receptors were quantified by Real-time PCR. **Results:** The expression of kinin B1 receptor was markedly increased in VAT than in SAT of patients with Cushing's syndrome (p <0.05). mRNA expression of kinin B2 receptor in SAT and VAT in Cushing's syndrome patients was not different between both fat deposits (p > 0.05). **Conclusion:** Our data suggest that chronic hypercortisolism, as seen in Cushing's syndrome is related to the higher amount of kinin B1 receptors in VAT, the fat deposit responsible for obesity-related complications and increased mortality.

**Key words:** Kinins, Adipose Tissue, Cushing's syndrome.

**Descritores:** Cininas, Tecido Adiposo, Síndrome de Cushing.

## Introduction

It is known that Cushing's syndrome (CS) results in hypertension in more than 90% of cases and in visceral obesity in more than 80% of cases<sup>1</sup>, plus a range of other signs and symptoms<sup>2</sup>. One of the characteristics of this syndrome is the presence of very high glucocorticoids levels, thus responsible for many biological disturbances observed in CS patients. Glucocorticoids have an important role in determining the metabolism and adipose tissue distribution. Patients with CS or subjects receiving long-term corticosteroid therapy develop reversible obesity<sup>3</sup>. SC is associated with an increased deposition of intra-abdominal fat compared with subcutaneous deposition. Cortisol directly or indirectly increases the total mass of adipose tissue and redistributes from the periphery to visceral deposits, with redistribution of the peripheral compartment to visceral deposits after treatment<sup>3</sup>. It is well established that the accumulation of visceral fat rather than subcutaneous is most frequently associated with premature death from cardiovascular disease<sup>4</sup>.

Lipolysis is activated by glucocorticoids, releasing free fatty acids in the circulation. However, in humans, the effect of chronic excess of glucocorticoids is more complex, in which the deposition of visceral adipose tissue is stimulated. The explanation for this predilection for visceral obesity could be linked to an increased expression of glucocorticoid receptor (GR) and the enzyme 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11  $\beta$ -HSD1), the enzyme responsible for the conversion of the inactive cortisone to cortisol, in this compartment<sup>5-8</sup>, although the matter is still controversial<sup>9,10</sup>. The action of corticosteroids is partly regulated by 11  $\beta$ -HSD1, mainly stimulating adipocytes differentiation and increasing glucocorticoid receptor expression<sup>10</sup>.

CS is characterized by abdominal obesity with adipocyte hypertrophy and hyperplasia, lipoprotein lipase (LPL) activity 2 to 3 times higher compared to healthy women and low lipolytic activity<sup>11</sup>. The hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is an important pathogenic factor for abdominal obesity. In hyperinsulinemia states, associated with the well known insulin resistance in hypercortisolism, decreased levels of GH could increase the LPL activity and reduce its lipolytic activity<sup>12</sup>.

Gene expression of components of the Kallikrein-kinin in states of hypercortisolism such as observed in Cushing's syndrome or their regional localization (visceral and subcutaneous

adipose tissue) in CS are still to be understood. Kinins are generated in the circulation and tissues by enzymatic hydrolysis of its precursor peptide, the kininogen by the action of kallikrein. The hydrolysis of kininogen leads to the formation of bradykinin, the main effector of the kallikrein-kinin system (Figure 1). This peptide has high affinity for the B2 receptor and from this interaction, derives the majority of the cardiovascular effects of kinins, including control of blood pressure and vasodilation<sup>13</sup>. Bradykinin is also subject to enzymatic digestion by carboxipeptidases, being the product of this reaction - des-Arg9-BK - holder of high affinity for the kinin B1 receptor. This receptor is involved in inflammatory and pain states<sup>14</sup>. The receptors B1 and B2 kinin receptors are transmembrane G protein-coupled, however, have their own characteristics. While the B2 receptor is constitutively expressed and ubiquitous distribution, the B1 receptor is poorly expressed and increased expression occurs preferred in pathological conditions.

### **(Figure 1)**

To our knowledge, there are few studies on the gene expression of components of the kallikrein-kinin system in CS. Moreover, there is increasing interest in the mechanisms involved in the preference of visceral fat deposition, as occurs in the CS, Metabolic Syndrome (MS) and deficiency states of Growth Hormone (GH). The quantification of kinin B1 and B2 receptors mRNA expression in visceral and subcutaneous adipose tissues in the CS could contribute to better understanding their distribution in human adipose tissue and the modulation of this system in hypercortisolism state. The main objective of this study was to identify levels of kinin B1 and B2 receptors mRNA expression in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues of endogenous Cushing's syndrome patients, adjusted for body mass index and age.

## **Method**

### **Subjects/Procedures**

This preliminary study, previously approved by the local Ethics Committee, was composed of adipose tissue collected of five (05) patients with endogenous hypercortisolism undergoing elective abdominal surgery, adjusted for age, sex and BMI. Sample tissues were

obtained from patients with endogenous CS referred electively for open laparotomy surgery or videolaparoscopy in the Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Hospital Geral de Goiânia (HGG), Hospital do Servidor Público Estadual do Estado de São Paulo, Hospital do Brigadeiro and Hospital da Beneficência Portuguesa. Samples were processed in the Biology Molecular laboratory from UNINOVE. The study was constituted by female patients with endogenous Cushing's syndrome. Cushing's syndrome (CS) was defined as endogenous by usual procedures such as lack of suppression of basal cortisol (saliva or plasma) after 1 mg dexamethasone to values smaller than 1.8 mg/m. The diagnosis of adrenal Cushing's syndrome was established by elevated 23pm salivary cortisol (SC), lack of cortisol suppression after overnight 1mg oral dexamethasone, increased 24h urinary free cortisol excretion and undetectable plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) levels, and confirmed in all on pathology grounds. Exclusion criteria included the presence of any inflammatory and/or malignant condition, diabetes, fasting impaired glucose (>5.6 mmol/liter) or current use of medications known to interfere with 11 $\beta$ -HSD1 expression or function.

### **Biological samples extraction**

The night before elective surgery, the patient was interviewed to fill the protocol with identifying and anthropometric data. Data concerning values of laboratory diagnostics, radiology, comorbidities and drugs in use by the patients were extracted from medical records. At 23 pm of the day before surgery, samples of salivary cortisol were collected. Saliva samples were centrifuged at 700 x g and kept frozen until the assay. Salivary cortisol was measured in 25 $\mu$ l saliva aliquots by an in-house radioimmunoassay (RIA) without previous extraction or chromatography, as previously described<sup>15</sup>. In brief, the intra- and inter-assay coefficients of variation were 4.4% and 5.1%, respectively, with a detection limit of 10 ng/dL. During surgery, after general anesthesia, approximately 2.0 g samples of adipose tissues were extracted from the level of the umbilicus or from infra-costal region (subcutaneous adipose tissue, SAT) and from omental fat (visceral adipose tissue, VAT). The samples were stored on dry ice and stored at -70<sup>0</sup>C for gene expression quantification.

### **Gene expression analysis**

To quantify the mRNA of kinin B1 and B2 receptors, we used the polymerase chain reaction (RT-PCR) using a Real-Time thermocycler (ABI 7700, Applied Biosystems). The SYBR Green method was used to detect the binding of a fluorescent substance (dye) to DNA. While not bound to DNA, the dye exhibits little fluorescence in solution, but during the elongation phase increasing amounts of the substance bind to stretched DNA. During the polymerization step, more and more molecules of dye bind to newly synthesized DNA and an increase in fluorescence can be monitored in real time<sup>16</sup>. Primers sets used for PCR reactions were: kinin B1 receptor (access number NM\_030851, GenBank<sup>TM</sup>) forward 5'-CCAGGGTTCGTCATCACTATCTG-3' and reverse 5'-GCAAAAGGAAGAAGGACAAGACTAA-3' and kinin B2 receptor (access number NM\_173100.1, GenBank<sup>TM</sup>) forward 5'-CCCTTCCTCTGGGTCCTCTT-3' and reverse 5'-CAGAACACGCTGAGGACAAAGA-3'. As an internal control was used the Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH, access number NM 017008, GenBank<sup>TM</sup>) forward 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' and reverse 5'-GCCCCACGGCCATCA-3'. All oligonucleotides were synthesized by Invitrogen and tested in previous studies<sup>17,18</sup>. The fluorescence was detected automatically by the filters of the device, and was immediately transferred to the analysis software. The experiments were performed in duplicate. As controls for reaction specificity, we used two parameters: the presence of only one fluorescence peak in the protocol of dissociation, and the absence of any amplification in the reactions with the negative control of reverse transcription.

### **Statistical Analysis**

Data were analyzed by analysis of variance ANOVA and Tukey-Kramer multiple comparisons *post hoc* to determine differences between groups. A *p* value <0.05 was considered to represent a statistically significant data.

### **Results**

#### **Clinical data**

Clinical data of the five patients with CS revealed that the average age was 40.2±11.7 years, with a BMI of 27.6±5.6 kg/m<sup>2</sup>. The waist and hip circumferences averages were

94.8±20.3 cm and 98.6±9.0 cm, respectively. The averaged salivary cortisol levels detected in these patients was 1378.8±807.5 ng /dl.

### **Gene expression data**

As shown in Figure 2, mRNA expression of kinin B1 receptor was significantly higher in VAT (0.84±0.19) when compared to SAT expression (0.35±0.12;  $p < 0.01$ ).

### **(Figure 2)**

The gene expression of kinin B2 receptor in SAT (0.59±0.31) and VAT (0.38±0.27) of Cushing's patients did not reach statistical significance (Figure 3;  $p > 0.05$ ).

### **(Figure 3)**

## **Discussion**

In the present study, the expression of B2 receptor mRNA was not different between SAT and VAT in Cushing's patients. A study testing kinin B2 receptor gene as candidate in the pathogenesis of insulin resistance failed to prove an association of kinin B2 gene polymorphism with different levels of insulin resistance within a population of obese patients. In our study, regarding to B2 gene expression, although there was no difference between the two fat deposits analyzed, local expression of this receptor was showed in both compartments<sup>19</sup>. Due to study limitations as sample size, it is difficult to draw a real scenario of kinin B2 receptor participation in Cushing's syndrome.

However, we demonstrated here that kinin B1 receptors expression increased in VAT of Cushing's patients. Actually, VAT appears biologically more active than SAT and responsible for obesity-related complications and increased mortality<sup>12</sup>. As kinin B1 receptor is either absent or weakly expressed in healthy animals and humans<sup>20</sup>, the fact that it is mostly involved in the chronic phase of inflammation<sup>21</sup> corroborates our findings. Moreover, an interesting study<sup>22</sup> showed evidences that the pharmacological inhibition of kinin B1 receptor decreased several inflammatory markers of obesity and insulin resistance in glucose-fed rats. The loss of body weight gain and fat mass gain by B1 blockade in

glucose-fed rats was associated with a reduction of plasma monounsaturated fatty acids (contributing to insulin resistance)<sup>23</sup>, indicating that kinin B1 receptor may be involved in the signaling of obesity.

Obesity is a chronic mild inflammation disease linked to augmented levels of pro-inflammatory cytokines in the circulation and peripheral tissues<sup>24</sup>. Adipose tissue actively secretes a variety of adipocytokines (leptin, resistin, adiponectin, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ )<sup>25</sup> that contributes to the inflammatory process, and also are involved in appetite and satiety signals, energy balance and energy expenditure. Dysregulation of adipose tissue-derived IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  results in impaired insulin signaling and lipid metabolism<sup>26</sup>.

As kinin B1 receptor is induced and up-regulated following tissue injury, its contribution to inflammatory states has been shown, initially mediating neutrophil migration and infiltration of macrophages<sup>14</sup>. Kinin B1 receptor activation on these cells causes the release of cytokines<sup>27</sup>. Kinin B1 receptor antagonist reversed the infiltration of macrophages in inflammatory tissue<sup>28</sup>. Macrophages represent an important source of pro-inflammatory cytokines known to propagate and amplify the inflammatory process in adipose tissue<sup>29</sup>.

In addition, functional deficiency of the kinin B1 receptor can protect mice from obesity through a mechanism that may involve leptin signaling<sup>30</sup>. Thus, a possible therapeutic use of kinin B1 receptors antagonist in Cushing's syndrome is strengthened with the results from our study.

## **Conclusion**

Our data suggest that chronic hypercortisolism, as seen in Cushing's syndrome is related to the higher amount of kinin B1 receptors mRNA in VAT, the fat deposit responsible for obesity-related complications and increased mortality. Gene expression of kinin B2 receptor remained unchanged. Based on these preliminary results, we intend now to compare the group of patients with Cushing's syndrome with obese and nonobese subjects. The extraction of biological material of these new groups has already been performed and the mRNA expression analysis is being developed in our laboratory. In addition, we are not sparing efforts to increase the number of patients with Cushing's syndrome, which will allow a more accurate analysis of kinin B1 and B2 receptors expression in human adipose deposits.

### Acknowledgments

This work was supported by FAPESP, CNPq and Uninove. We also would like to thank all patients for permitting the use of the biological material.

### References

1. Stewart PM. Tissue-specific Cushing's Syndrome, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and the redefinition of corticosteroid hormone action. *Eur. J. Endocrinol.* 2003; 149:163-8.
2. Stewart PM. The Adrenal Cortex. In: Melmed S., Williams RH, editors. *Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: Saunders; 2003. p.491-539.
3. Sjostrom L. e cols. Changes in body composition and adipose tissue distribution after treatment of women with Cushing's Syndrome. *Metabolism*, 1994; 43(12):1517-22.
4. Garrapa GGM, Pantanetti P, Arnaldi G, Mantero F, Faiola E. Body composition and metabolic features in woman with adrenal incidentalomas or Cushing syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86(11): 5301-6.
5. Walker B.R., Olsson T. e cols. Local and systemic impact of transcriptional up-regulation of 11 $\beta$ -hydrosteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue in human obesity. *J. Clin. Endocrinol.*, 2003; 88(8):3983-8.
6. Lacroix OP, Boullu S, Oliver C, Alessi MC, Grino M. Expression of the mRNA coding for 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue from obese patients: An *in situ* hybridization study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87(6):2701-5.
7. Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet*, 1997; 349:1210-3.



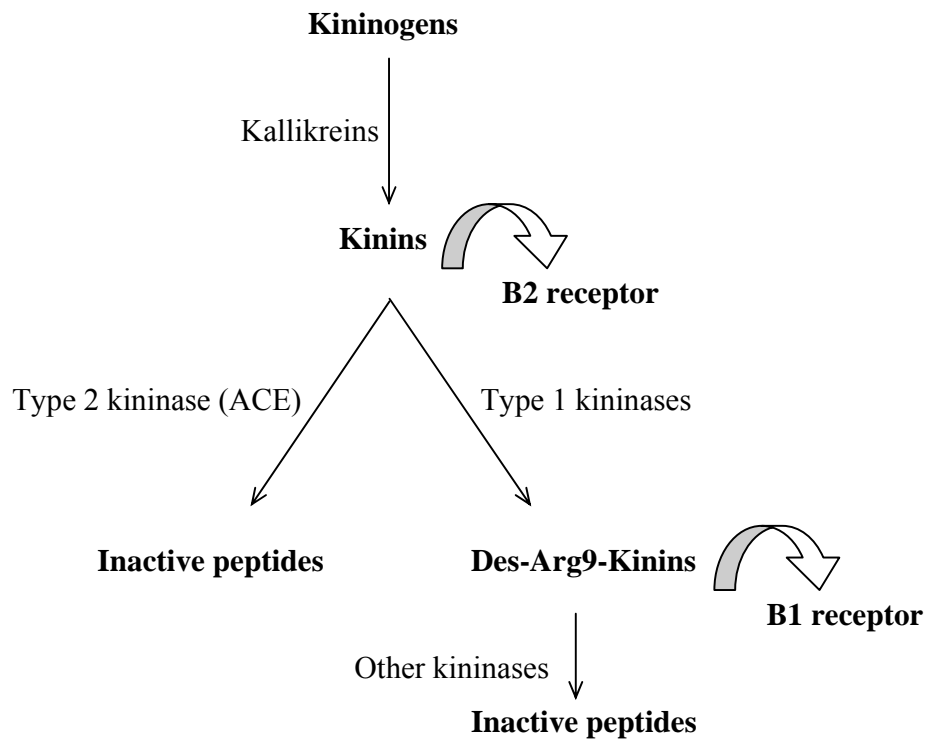
8. Livingstone DEW, Jones GC, Smith K.e cols. Understanding the role of glucocorticoids in obesity: Tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese zucker rats. *Endocrinology*, 2000; 141(2) 560-3.
9. Stewart PM, Bouton A, Kumar S, Clark PM, Shakleton CH. Cortisol metabolism in human obesity:impaired cortisolone→cortisol conversion in subjects with central adiposity. *Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84(3):1022-7.
10. Rask E, Olsson T, Soderberg S, Andrew R, Livingston DE, Johnson O, Walker BR. Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86:1418-21.
11. Rebuffe-Scrive M, Krotkiewski M, Elverson J, Bjorntorp P. Muscle and Adipose Tissue Morphology and Metabolism in Cushing's Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998; 67:1122-8.
12. Wajchenberg BL. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000; 21(6) 697-738.
13. Silva JA Jr, Araujo RC, Baltatu O, Oliveira SM, Tschöpe C, Fink E et al. Reduced cardiac hypertrophy and altered blood pressure control in transgenic rats with the human tissue kallikrein gene. *FASEB J.* 2000; 14(13):1858-60.
14. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T et al. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(14):8140-5.
15. Vieira JGH, Noguti KO, HidaI JT, Russo EMK, Maciel RMB: Assay of salivary cortisol as a method to evaluate its free fraction in serum (port). *Arq Bras Endocrinol Metab* 1984; 28:8-10.

16. Goto EM ; Silva MP ; Argañaraz GA ; Perosa SR ; Pesquero JB ; Cavalheiro EA et al. Akt pathway activation and increased neuropeptide Y mRNA expression in the rat hippocampus: implications for seizure blockade. *Neuropeptides (Edinburgh)* 2010; 44: 169-76.
17. Argañaraz GA, Silva JA Jr, Perosa SR, Merino V, Bascands JL, Bader M et al. Role of kinin receptors in the lobe temporal epilepsy induced by pilocarpine in Wistar rats. *Brain Research* 2004; 1006(1):114-26.
18. Bortone F, Santos, HA, Albertini, R, Pesquero JB, Costa, MS, Silva JA Jr. Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *Int Immunopharmacology* 2008; 8: 206-10.
19. Fallo F, Mulatero P, Vettor R, Scarda A, Della Mea P, Morello F et al. Bradykinin B2 receptor gene C-58T polymorphism and insulin resistance. A study on obese patients. *Horm Metab Res.* 2004; 36(4):243-6.
20. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Ver.* 2005; 57: 27–77.
21. Couture R, Girolami JP. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol.* 2004; 500: 467–85.

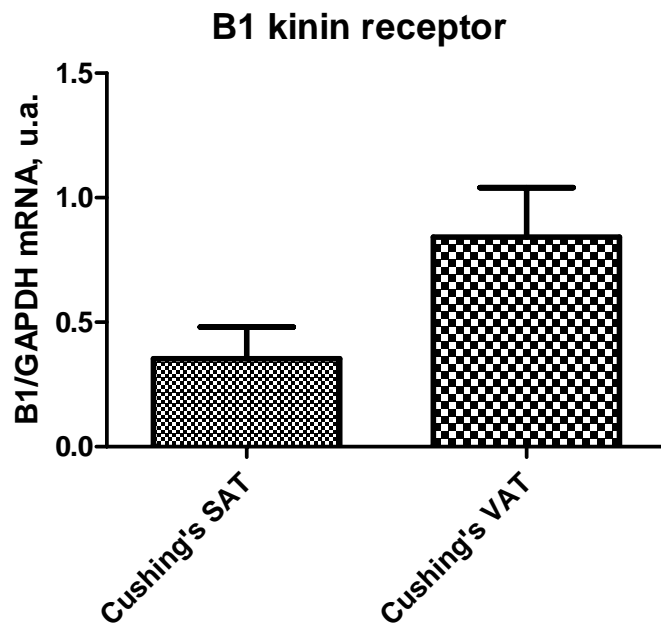
22. Dias JP, Couture R. Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes Obes Metab.* 2011; doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01521.x.
23. B Vessby. Dietary fat and insulin action in humans. *Br J Nutr.* 2000;83 Suppl 1:S91-S96.
24. G Lepage, CC Roy. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1986; 27:114-20.
25. Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, Kramer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M: Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem* 2008; 114: 183-94.
26. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11: 98-107.
27. Bouthillier J, Deblois D, Marceau F. Studies on the induction of pharmacological responses to des-Arg9-bradykinin in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 257-64.
28. Klein J, Gonzalez J, Duchene J et al.: Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *FASEB J* 2009; 23: 134-42.
29. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR: Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 2007; 56: 16-23.

30 Mori MA, Araújo RC, Reis FC, Sgai DG, Fonseca RG, Barros CC et al. Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. *Diabetes*. 2008; 57(6):1491-500.

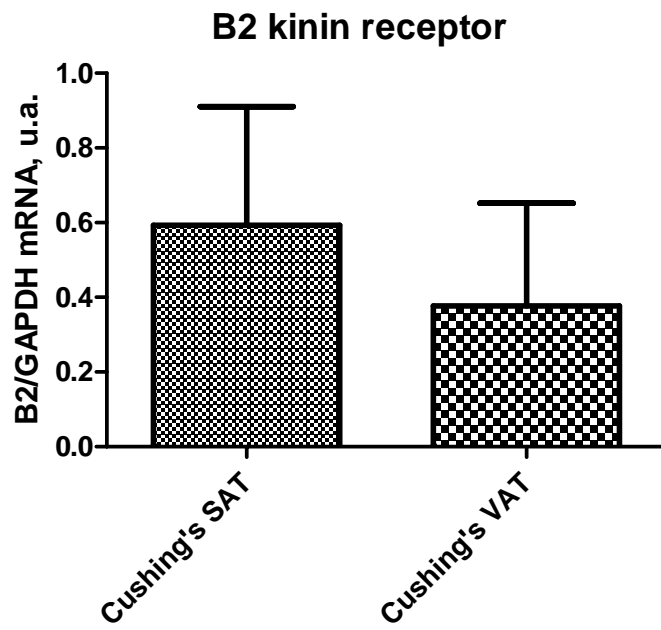
## FIGURES



**Figure 1.** Hydrolysis representation of kallikrein-kinins system. ACE (Angiotensin-Converting Enzyme).



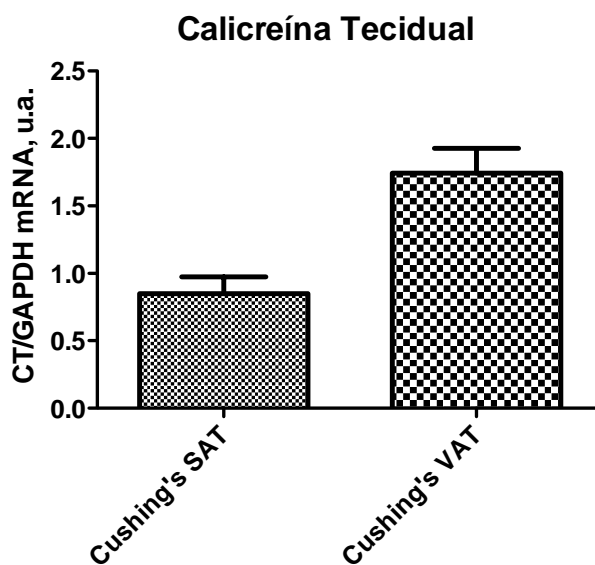
**Figure 2.** Quantification of kinin B1 receptor gene expression in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues. An augmented mRNA expression of kinin B1 receptor was observed in VAT when compared to its SAT expression ( $p < 0.01$ ).



**Figure 3.** Quantification of kinin B2 receptor gene expression in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues. The gene expression of kinin B2 receptor was similar in both SAT and VAT depots ( $p > 0.05$ ).

## 5. Dados adicionais

A expressão de caliceína tecidual foi maior em VAT ( $1,74 \pm 0,18$ ) quando comparada com SAT de pacientes com Síndrome de Cushing ( $0,85 \pm 0,13$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figure 4.** Quantificação da expressão gênica de caliceína tecidual em tecido adiposo subcutâneo (SAT) e visceral (VAT) em pacientes com Síndrome de Cushing.

## 6. Considerações Finais

No presente estudo, a expressão de mRNA do receptor B2 não foi diferente entre SAT e VAT em pacientes de Cushing. Um estudo testando o gene do receptor B2 de cininas como candidato na patogênese da resistência à insulina não conseguiu provar uma associação de um polimorfismo do gene B2 de cininas com diferentes níveis de resistência à insulina em uma população de pacientes obesos (22). Em nosso estudo, com relação à expressão do gene B2, apesar de não haver diferença entre os dois depósitos de gordura analisados, a expressão local desse receptor foi mostrado em ambos os compartimentos. Devido à limitações do estudo como tamanho da amostra e dificuldade de obtenção de pacientes com Cushing, é difícil traçar um cenário real de participação dos receptores B2 de cininas na SC.

No entanto, demonstramos aqui que a expressão de receptores B1 de cininas e de calicreína tecidual aumentou em VAT de pacientes com Cushing. Na verdade, o VAT parece ser biologicamente mais ativo do SAT e responsável por complicações relacionadas à obesidade e aumento da mortalidade (23).

Como o receptor B1 de cininas está ausente ou fracamente expresso em animais e humanos saudáveis (24), o fato de que este receptor está principalmente envolvido na fase crônica da inflamação (25) corrobora nossos achados. Além disso, um interessante estudo (26) mostrou evidências de que a inibição farmacológica do receptor B1 de cininas leva à diminuição de vários marcadores inflamatórios da obesidade e resistência à insulina em ratos alimentados com glicose. A perda de ganho de peso e ganho de gordura por



bloqueio do receptor B1 em ratos alimentados com glicose foi associado com uma redução de plasma de ácidos graxos monoinsaturados (contribuindo para a resistência à insulina) (23), indicando que receptores B1 de cininas podem estar envolvidos na sinalização da obesidade.

A obesidade é uma doença inflamatória leve e crônica associada a níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias na circulação e tecidos periféricos (24). O tecido adiposo secreta ativamente uma variedade de adipocitocinas (leptina, resistina, adiponectina, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) (25), que contribui para o processo inflamatório, e também estão envolvidos no apetite e sinais de saciedade e no balanço e gasto energético. A desregulação das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  do tecido adiposo resulta na sinalização deficiente da insulina e do metabolismo de lipídeos (26).

Como o receptor B1 de cininas é induzido e mais expresso após lesão tecidual, sua contribuição para processos inflamatórios tem sido demonstrada, inicialmente por mediar a migração de neutrófilos e infiltração de macrófagos (34). A ativação do receptor B1 de cininas nessas células resulta na liberação de citocinas (27). O uso de um antagonista do receptor B1 de cininas previniu a infiltração de macrófagos em tecidos inflamados (28). Os macrófagos representam uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias conhecidas para propagar e amplificar o processo inflamatório no tecido adiposo (29). Além disso, a deficiência funcional do receptor B1 de cininas pode proteger ratos da obesidade por meio de um mecanismo que pode envolver a sinalização pela leptina (30). Assim, um possível uso terapêutico de antagonistas dos receptores B1 de cininas na Síndrome de Cushing é reforçado com os resultados do nosso estudo.

Uma maior expressão de calicreína tecidual pode resultar em efeitos deletérios ou protetores da bradicina (BK) e seus receptores B1 e B2. Em culturas de células mesangiais, por exemplo, a BK reduz a secreção de fibronectina induzida por macrófagos condicionados no meio (31) e aboliu ativação e proliferação de ERK1 / 2 induzida pelo IGF-I (32), mas também foi relatado um aumento da expressão de mRNA de TGF- $\beta$  e colágeno (33). Para nosso conhecimento, não existem dados sobre o efeito da BK em Síndrome de Cushing. A calicreína tecidual aumentada poderia clivar mais bradicinina que estaria disponível para ativação dos receptores B2 de cininas. Como não observamos um aumento destes receptores em pacientes com Cushing, apesar de possuírem uma expressão basal considerável, poderiam sofrer ação de cininases do tipo I, como a carboxipeptidase M (CPM), e o produto desta hidrólise - des-Arg9-BK – poderia ativar os receptores B1, contribuindo para o processo inflamatório leve do tecido adiposo.

Com base nos resultados preliminares, pretendemos comparar o grupo de pacientes com Síndrome de Cushing com indivíduos obesos e não obesos. A extração de material biológico desses novos grupos já foi realizada e a análise de expressão de mRNA está sendo desenvolvida em nosso laboratório. Além disso, não estamos poupando esforços para aumentar o número de pacientes com Síndrome de Cushing, o que permitirá uma análise mais acurada da expressão de receptores de cininas B1 e B2 em depósitos adiposos humanos.

## **7. Conclusão**

Nossos dados sugerem que o hipercortisolismo crônico, como visto na Síndrome de Cushing está relacionada com a maior quantidade de mRNA de receptores B1 de cininas e calicreína tecidual em tecido adiposo visceral (VAT), o depósito de gordura responsável por complicações relacionadas à obesidade e aumento da mortalidade. A expressão do gene do receptor B2 de cininas manteve-se inalterada.

## 8. Referências Bibliográficas (Contextualização e Considerações Finais)

1. STEWARD PM. THE ADRENAL CORTEX. IN: LARSEN R, KRONENBERG HM, MELMED S, POLONSKY KS, eds. **Williams Textbook of Endocrinology**. 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 2003. pp. 491-551.
2. VILAR L, COELHO CE. Diagnóstico e diagnóstico diferencial da Síndrome de Cushing. In: Vilar L, ed. **Endocrinologia clínica**. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. pp. 397- 417.
3. ARNALDI G, ANGELI A, ATKINSON AB, BERTAGNA X, CAVAGNINI F, CHROUSOS GP, ET AL. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 2003; 88: 5593-602.
4. LONN L, KIVIST H, ERNEST I, SJOSTROM L. Changes in body composition and adipose tissue distribution after treatment of women with Cushing's syndrome. **Metabolism**, 1994; 43 (12): 1517-1522.
5. TAUCHMANOVÀ L, ROSSI R, BIONDI B, PULCRANO M, NUZZO V, PALMIERI EA, ET AL. Patients with subclinical Cushing's syndrome due to adrenal adenoma have increased cardiovascular risk. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 2002; 87: 4872-8.
6. STEWART, PM. Tissue-specific Cushing's Syndrome, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and the redefinition of corticosteroid hormone action. **Eur. J. Endocrinol**, 2003; 149:163-168.
7. STEWART, PM IN WILLIAMS. The Adrenal Cortex. In: P Reed Larsen, et al. **Textbook of Endocrinology**, 10 ed. Philadelphia: Saunders, 2003. p. 491-539.

8. Gaunt R. History of adrenal cortex. In Greep RO, Astwood EB. **Handbook of physiology: Endocrinology. Washington, DC, American Physiological Society**, 1975, section 7, vol. 6, p 1.
9. BAXTER JD, TYRREL JB. The adrenal cortex. In Felig P, Baxter JD, Broadus AE et al. **Endocrinology and Metabolism. New York, McGraw-Hill Book**, 1988; 511-650.
10. FUNDER JW, PEARCE PT, SMITH R ET AL. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. **Science**, 1988; 242: 583-5.
11. TYRREL JB, BAXTER JD. GLUCOCORTICOID THERAPY. In Felig P, Baxter JD, Broadus AE et al. **Endocrinology and Metabolism. New York, McGraw-Hill Book**, 1988; 788-817.
12. TSAY SY, CARLSTEDT-DUKE J, WEIGEL NL ET AL. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. **Cell**, 1988; 55: 361-9.
13. GUSTAVSON LE, BENET LZ. Pharmacokinetics of natural and synthetic glucocorticoids. In Anderson DC, Winter JSD. The adrenal cortex. **Stoneham, Mass, Butterworth Publishers**, 1985; 235-79.
14. Ellis EF. Corticosteroid regimens in pediatric practice. **Hosp Pract**, 1984; 19:143-51.
15. SCHURMEYER TH, TSOKOS GC, AVGERINOS PC ET AL. Pituitary-adrenal responsiveness to corticotropin-releasing hormone in patients receiving chronic, alternate day glucocorticoid therapy. **J. Clin. Endocrinol Metab.** 1985; 61: 22-7.

16. CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, 2000; 87: 1-5.
17. SCHÖLKENS, B. Kinin in the cardiovascular system. **Immunopharmacology**, 1996; 33: 209-216.
18. BHOOLA, K.D., FIGUEROA, C.D., WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacol.** 1992; 44: 1-79.
19. DIETZE, G. Modulation of the action of insulin in relation to the energy state in skeletal muscle tissue: possible involvement of kinins and prostaglandins. **Mol. Cell. Endocrinol.** 1982; 25:127-129.
20. PESQUERO, J.B., PESQUERO, J.L., OLVEIRA, S.M., ROSCHER, A.A., METZGER, R., GANTEN, D., BADER, M. Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B1 receptor gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1996; 220: 219-225.
21. SCHANSTRA, J.P., BATAILLÉ, E., MARIN CASTAÑO, M.E., BARASCUD, Y., HIRTZ, C., PESQUERO, J.B., PECHER, C., GAUTHIER, F., GIROLAMI, J.P., BASCANDS, J.L. The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1- receptor in cultured human lung fibroblasts. **J. Clin. Invest.** 1998; 101: 2080-2091.
22. FALLO F, MULATERO P, VETTOR R, SCARDA A, DELLA MEA P, MORELLO F ET AL. Bradykinin B2 receptor gene C-58T polymorphism and insulin resistance. A study on obese patients. **Horm. Metab. Res.** 2004; 36(4):243-6.
23. WAJCHENBERG BL. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 2000; 21(6) 697-738.

24. LEEB-LUNDBERG LM, MARCEAU F, MULLER-ESTERL W, PETTIBONE DJ, ZURAW BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol Ver.** 2005; **57**: 27–77.
25. COUTURE R, GIROLAMI JP. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. **Eur. J. Pharmacol.** 2004; **500**: 467–85.
26. DIAS JP, COUTURE R. Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. **Diabetes Obes. Metab.** 2011; doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01521.x.
27. BOUTHILLIER J, DEBLOIS D, MARCEAU F. Studies on the induction of pharmacological responses to des-Arg9-bradykinin in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.** 1987; 92: 257-64.
28. KLEIN J, GONZALEZ J, DUCHENE J ET AL.: Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. **FASEB J.** 2009; 23: 134-42.
29. LUMENG CN, DEYOUNG SM, BODZIN JL, SALTIEL AR: Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. **Diabetes**, 2007; 56: 16-23.
30. MORI MA, ARAÚJO RC, REIS FC, SGAÍ DG, FONSECA RG, BARROS CC ET AL. Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. **Diabetes**, 2008; 57 (6): 1491-500.

31. ALRIC C, PECHER C, CELLIER E, ET AL. Inhibition of IGF-I-induced Erk 1 and 2 activation and mitogenesis in mesangial cells by bradykinin. **Kidney Int.** 2002; 62:412-421.
32. TSCHOPE C, SEIDL U, REINECKE A, ET AL. Kinins are involved in the antiproteinuric effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in experimental diabetic nephropathy. **Int. Immunopharmacol**, 2003; 3: 335-344.
33. EVANS RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, 1988; 240: 889-895.
34. PESQUERO JB, ARAUJO RC, HEPPENSTALL PA, STUCKY CL, SILVA JA JR, WALTHER T ET AL. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A.** 2000; 97 (14): 8140-5.



## **9. Apêndice**

Artigo “**Atividade Física Intensa: Papel do Óxido Nítrico na Apoptose**”

submetido e aceito na revista Terapia Manual.

**Atividade Física Intensa: Papel do Óxido Nítrico na Apoptose**

Intense Physical Activity: Role of Nitric Oxide in Apoptosis

Rafael Ribeiro – Mestre em Ciências da Reabilitação da UNINOVE – Especialista em Odontologia em Saúde Coletiva- dr.rafaelribeiro@bol.com.br

Dannylo Wesley Nóbrega de Sousa – Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da UNINOVE – dannylowesley@gmail.com

Tábata Santos Oliveira – Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da UNINOVE – oliveira.tabata@gmail.com

Kristianne Porta Santos Fernandes – Profa. Dra. do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da UNINOVE – kristianneporta@terra.com.br

José Antônio Silva Junior\* - Prof. Dr. do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da UNINOVE – josejr@uninove.br

\*Autor correspondente: José Antônio Silva Junior - UNINOVE, Rua Vergueiro, 235 - Liberdade 01504-001 São Paulo, SP – Brasil – Phone/Fax +551133859066 - josejr@uninove.br

## **Atividade Física Intensa: Papel do Óxido Nítrico na Apoptose**

### **Resumo**

A apoptose é descrita como a morte necessariamente regulada, com características bioquímicas, moleculares e morfológicas específicas, desempenhando considerável função durante o desenvolvimento do indivíduo, na homeostase do organismo e em algumas doenças. O tecido muscular quando em exercício físico prolongado pode sofrer danos, principalmente na contração muscular excêntrica e a literatura evidencia a participação da apoptose nesse processo. Essa ligação pode se dar pela inibição do fator de crescimento, pelo aumento intracelular dos níveis de cálcio e pela liberação de espécie reativa de oxigênio (ERO) que são alguns sinais que podem induzir a apoptose. O óxido nítrico (NO) é exemplo de ERO, cuja produção excessiva nos músculos esqueléticos provoca injúria oxidativa e apoptose, resultando em distrofia muscular, caquexia e envelhecimento.

Descritores: Músculo esquelético. Apoptose. Óxido nítrico. Exercício.

## **Intense Physical Activity: Nitric Oxide Role in Apoptosis**

### **Abstract**

Apoptosis is described like a necessarily regulated death, with biochemical, molecular and morphological specific characteristics, playing considerable function during the human development, in the organism homeostasis and in some diseases. The muscular tissue when in exercise during long time can damage yourself, mainly in freak muscular contraction and the literature shows the role of apoptosis in this process. This link can occur for the inhibition of the grow factor, increase of calcium and reactive oxygen species, that are some signs that can induce the apoptosis. Nitric oxide (NO) is an example of ROS (reactive oxygen specie), where high productions of NO in the skeletal muscles promotes oxidative injury and apoptosis, leaving to muscular dystrophy, cachexia, disuse and aging.

Key-words: Skeletal muscle. Apoptosis. Nitric oxide. Exercise.

## **Atividade Física Intensa: Papel do Óxido Nítrico na Apoptose**

Intense Physical Activity: Nitric Oxide Role in Apoptosis

### **Introdução**

As células musculares constituintes do tecido responsável pela sustentação e movimentação do corpo, o músculo estriado esquelético, são células cilíndricas alongadas, com estriações transversais e que apresentam características específicas e por isso diferem quanto à nomenclatura de suas estruturas. O citoplasma recebe o nome de sarcoplasma, já o retículo endoplasmático é conhecido como retículo sarcoplasmático e a membrana citoplasmática é chamada de sarcolema, membrana essa que se contacta com os núcleos das células que se apresentam na periferia do sarcoplasma<sup>1</sup>.

O tecido muscular se origina de um conjunto de células decorrentes da fusão de mioblastos que se organizam em feixes cilíndricos e multinucleados. Cada fibra muscular é revestida pelo endomísio, que é uma camada de tecido conjuntivo. Essas fibras por sua vez são organizadas em feixes mantidos unidos por outra camada de tecido conjuntivo, conhecida como perimísio, passando a constituir o fascículo. O grupo de fascículos com feixes de fibras musculares é mantido unido por outra camada semelhante chamada de epimísio, que também contém vasos sanguíneos e tecido nervoso. Por fim, os fascículos também são revestidos por um tecido conjuntivo denso e resistente, chamado de fáscia que além de recobrir todo o músculo, se estende ainda mais para formar o tendão fibroso responsável por fixá-lo ao osso<sup>2</sup>.

No interior de uma fibra muscular, que pode ser do tipo rápida ou lenta, há uma grande quantidade de estruturas orientadas longitudinalmente denominadas de miofibrilas, que são constituídas por filamentos protéicos contráteis de actina e miosina<sup>1</sup>.

O tecido muscular quando em atividade ou exercício físico prolongado pode sofrer danos, principalmente na contração muscular excêntrica, onde existe um alongamento após a contração, e a literatura evidencia a participação da apoptose nesse processo<sup>3</sup>.

De fato, os exercícios físicos extenuantes têm se mostrado como indutores de apoptose por promoverem aumento nas concentrações de cálcio intracelular, de produção de espécie reativa de oxigênio (ERO), de fator de necrose tumoral (TNF), além de aumentarem também a secreção de glicocorticóides<sup>3</sup>.

## **Revisão da Literatura**

### **1 Apoptose**

A apoptose, ou morte celular programada, é uma forma de morte celular que elimina células em processos de proliferação ou diferenciação celular, desenvolvendo um papel fundamental no desenvolvimento normal e homeostase tecidual<sup>4</sup>. Por meio da apoptose, um organismo saudável promove a renovação celular adequada mesmo em tecidos adultos removendo, por exemplo, as células que seriam consideradas indesejáveis e que apresentariam risco potencial para o organismo, como no caso de células infectadas por vírus e células tumorais<sup>3,5,6</sup>.

Pode se dizer que uma apoptose inapropriada ocorre em vários quadros patológicos, desde doenças neurodegenerativas como no caso da doença de Alzheimer, danos isquêmicos, desordens auto-imunes, até vários tipos de câncer<sup>5</sup>. Segundo Gerl & Vaux<sup>7</sup> existe controvérsia em relação ao fator chave no processo de apoptose, assim, alguns pesquisadores acreditam que seja a ativação das caspases e outros que creditam essa função à falha mitocondrial pela perda do *citocromo c* do espaço intermembranas.

A apoptose pode ser induzida por duas vias que embora distintas podem estar relacionadas: uma via extrínseca e uma intrínseca, também conhecida como via mitocondrial. A via extrínseca é ativada após a ligação dos chamados receptores de morte por membros da família TNF, como o TNF, CD95L (FasL/Apo-1L) e TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) e está associada com a ativação da caspase-8. A segunda via é ativada após uma perturbação mitocondrial, resultante do stress celular, da falta de fatores de crescimento ou de outras injúrias celulares<sup>8</sup>.

Todos os fatores necessários para promover esse processo de morte celular parecem estar presentes a todo o momento nas células, porém, a ativação dessa forma de suicídio celular é regulada por uma série de sinais diferentes que podem se originar tanto do meio extracelular como do meio intracelular<sup>6</sup>.

Os sinais bioquímicos da apoptose incluem, segundo Gerl & Vaux<sup>7</sup>, a ativação de proteases chamadas caspases, a clivagem de proteínas e de DNA, e a exposição de fosfatidilserina na superfície celular. As proteínas p53, Fas e Bax, por exemplo, iniciam a apoptose, enquanto as proteínas Bcl-2 e Bcl-x<sub>L</sub> a inibem, assim, a morte ou a sobrevivência da célula depende da razão entre os genes expressados<sup>3,4,9</sup>.

As caspases, uma classe de proteases de cisteína, são reconhecidas como fatores centrais no processo de apoptose dos mamíferos, ativando uma cascata de eventos de clivagem proteolítica. Esse nome se origina da seguinte forma: o “c” denota ser uma protease de cisteína e “aspase” se refere à habilidade dessas enzimas de clivar após um resíduo de ácido aspártico (*cysteine-aspartic-acid-proteases*). Nesse contexto, a caspase que apresenta particular interesse é a caspase-3, também conhecida como CPP32, Yama ou apopain, que é o membro mais estudado dessa classe e considerada um fator chave para a apoptose

acontecer, sendo responsável pela clivagem proteolítica total ou parcial de muitas proteínas<sup>5</sup>.

Morfologicamente existem muitas diferenças entre o processo de apoptose e o de necrose celular, ocorrendo necrose quando a célula em questão sofre uma injúria letal, provocando um inchamento e ruptura celular, com extravasamento dos constituintes citoplasmáticos devido ao rompimento da membrana citoplasmática, além de um processo inflamatório que acaba por afetar as células vizinhas também<sup>3</sup>.

Por outro lado, a apoptose por ser um fenômeno fisiológico e controlado geneticamente é caracterizada por uma diminuição do volume celular, compactação de organelas, alterações na membrana plasmática, invaginação e condensação da cromatina. Após a ativação de endonucleases e de caspases ocorre também uma fragmentação irreversível do DNA, com posterior fragmentação celular em corpos apoptóticos, que posteriormente serão fagocitados. Deste modo, as células vizinhas não são afetadas e não há indução de processo inflamatório<sup>3,5,10</sup>.

## **2 Radicais livres**

A produção celular de radicais de oxigênio tem sido relacionada a uma grande variedade de processos biológicos incluindo os mecanismos de defesa do organismo, a regulação de apoptose celular, a modulação de sinalização celular e as condições patológicas. Quando em altos níveis as EROs estão relacionadas com várias patologias, incluindo arteriosclerose, hipertensão, problemas cardíacos e envelhecimento<sup>11</sup>.

As espécies reativas de oxigênio (ERO), incluem o superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e o óxido nítrico (NO). A formação de ERO pode ser mediada por diversos sistemas enzimáticos como o



NADPH oxidase, óxido nítrico sintase, xantine oxidase e a cadeia respiratória mitocondrial<sup>11</sup>.

As ERO são espécies independentes que contêm um ou mais elétrons não pareados. A presença de elétrons não pareados no átomo ou na molécula aumenta a sua reatividade química garantindo aos radicais livres, grande instabilidade. Assim, estes compostos tendem sempre a acoplar o elétron não pareado com um outro elétron que esteja presente em estruturas próximas à sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons<sup>12</sup>.

## **2.1 Óxido nítrico**

O nitrogênio também participa da estrutura dos radicais livres, principalmente o óxido nítrico, cujo efeito tóxico contribui de modo importante para a lesão tecidual que ocorre nos processos inflamatórios crônicos e também na septicemia. Esse radical livre pode ser anulado na presença de vitamina C, que recupera o óxido nítrico e têm sua formação prevenida pela enzima superóxido-dismutase (SOD), que evita a conversão do óxido nítrico em suas formas oxidativas, apresentando efeito sinérgico com a L-arginina<sup>12</sup>.

O óxido nítrico (NO) é um gás sintetizado do aminoácido L-arginina por intermédio da enzima óxido nítrico sintase (NOS) em células vivas<sup>4,13,14</sup>, sendo considerado o menor mediador presente no organismo<sup>15</sup>. É evidente atualmente que o NO desempenha um importante papel em diversos fenômenos biológicos como agregação plaquetária, tônus vascular, transmissão sináptica, citotoxicidade<sup>14</sup>, reparo tecidual, remodelação tecidual e angiogênese<sup>11</sup>, além de atuar na resposta imunológica, na plasticidade neuronal, na sinalização intracelular e na indução de apoptose<sup>4,12,13,16</sup>.

O NO atua na mitocôndria inibindo sua respiração e modulando também sua permeabilidade, processo esse que está ligado à liberação de fatores apoptóticos como o *citocromo c*. A liberação dessa proteína representa um importante passo para a ativação de um subgrupo específico, CPP32 (caspase-3), da família das caspases, promovendo assim a apoptose. No entanto, o NO quando em baixas concentrações pode apresentar um efeito anti-apoptótico em alguns tipos células<sup>14</sup>.

O NO pode ser produzido por meio de três enzimas distintas (NOS-I, II e III), sendo que as NOS-I e NOS-III são expressas de forma constitutiva, como proteínas pré-formadas nas células, cuja atividade é desencadeada pela elevação da concentração de cálcio intracelular e conversão de calmodulina em resposta à neurotransmissores ou substâncias vasoativas. Já a NOS-II é expressa apenas em células ativadas, sendo chamada também de iNOS (*inducibleform*), sendo que sua liberação é controlada por vários meios incluindo a concentração de NO no tecido<sup>15</sup>.

Nos últimos anos descobriu-se que o NO atua como um modulador endógeno da fisiologia muscular, incluindo desde vasodilatação, até metabolismo e contração, podendo inclusive inibir a produção de força por alterar o processo excitação-contração<sup>17</sup>. De fato, as fibras musculares expressam individualmente uma ou ambas as formas constitutivas da NOS. A NOS-I (neuronal) está presente no sarcolema das fibras rápidas, enquanto que a NOS-III (endotelial) está associada com a mitocôndria<sup>17</sup>.

Porém, a literatura demonstra que uma produção excessiva de NO nos músculos esqueléticos provocam injúria oxidativa e morte celular programada, resultando em distrofia muscular, caquexia, e envelhecimento<sup>4</sup>.

Essa injúria oxidativa, também chamada de estresse oxidativo, ocorre quando há um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de uma forma em que os primeiros sejam predominantes<sup>12,18</sup>.

Tripathiet *al.*<sup>18</sup> apresentam um estudo em que foram utilizados inibidores de NOS em ratos onde se observou uma redução no grau de inflamação aguda ou artrite desses animais, por outro lado, a administração de L-arginine salientou a inflamação. É importante salientar que o NO pode ser citotóxico tanto para microorganismos como também para as próprias células que o produz e para as células vizinhas<sup>13,15</sup>.

Nesse caso, o efeito do NO depende da concentração, sendo que baixas ou moderadas concentrações de NO acabam por exercer funções protetoras contra oxidação, danos celulares e inclusive morte celular<sup>14,15</sup>. Por outro lado, altas concentrações desse gás provocam apoptose em vários tipos celulares, como miócitos e células de músculo liso<sup>4,15</sup>.

Leeet *al.*<sup>4</sup> relatam que o envelhecimento, doenças que provocam perda de tecido muscular e intensa contração muscular aumentam a produção de NO em músculos esqueléticos e quando em excesso esse NO promove o chamado estresse oxidativo e morte das células musculares.

## **Discussão**

Caiet *al.*<sup>19</sup> ao analisarem o efeito da atividade física (leve, moderada e intensa) no músculo gastrocnêmico de ratos verificaram que a apoptose ocorreu apenas nos animais que foram submetidos à intensidade moderada e intensa, obviamente, com níveis mais elevados naqueles que passaram pela atividade intensa. A apoptose continuou em taxas elevadas até o terceiro dia após terminar o exercício no grupo de atividade intensiva.

O mecanismo pelo qual o exercício induz apoptose na fibra muscular adulta ainda não é totalmente conhecido, no entanto, uma hipótese seria que o exercício ao aumentar o metabolismo muscular, promoveria uma maior produção de ERO que pode danificar o DNA e induzir diretamente a apoptose. Fibras predominantemente oxidativas (tipo I) podem ser oprimidas pelas ERO não conseguindo neutralizá-las, outra hipótese seria que o aumento de catecolaminas produzido pelo estresse da atividade física também induziria apoptose<sup>3</sup>.

A literatura também apresenta evidências de que a mitocôndria desempenha um papel fundamental na regulação da apoptose, uma produção aumentada de produtos oxidantes na mitocôndria de músculo esquelético durante o exercício tem sido observada e está relacionada com danos ao DNA e às proteínas. Sendo assim, quantidades significativas de DNA danificado poderiam dar início ao processo de apoptose por alterar a expressão de proteínas anti e pró-apoptóticas<sup>3</sup>.

O músculo esquelético isoladamente produz NO em baixas taxas em condições de repouso, e altas taxas durante contração repetitiva. O NO parece mediar interações entre células musculares, incluindo vasodilatação e inibição de adesão leucocitária<sup>17</sup>, no entanto, baixas ou moderadas concentrações de NO também exercem funções protetoras contra oxidação, danos celulares e inclusive morte celular<sup>14,15</sup>, enquanto que altas concentrações desse gás provocam apoptose em vários tipos celulares<sup>4,15</sup>.

## **5 Considerações finais**

A atividade física intensa pode danificar células musculares desencadeando um processo inflamatório, necrose e apoptose, no entanto, existiria uma possibilidade de se desenvolver medidas terapêuticas que pudessem atenuar este processo<sup>3</sup>.

**Referências:**

1. Mesquita IC. Lesão muscular induzida por bupivacaína em linhagens de camundongos predispostos a perfil distinto de citocinas [dissertação]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2007.
2. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
3. Voltarelli FA, Mello MAR, Duarte JAR. Apoptose e exercício físico: efeitos sobre o músculo esquelético. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum*. 2008; 10(1): 100-5.
4. Lee MH, Jang MH, Kim EK, Han SW, Cho SY, Kim CJ. Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J Pharmacol Sci*. 2005;97(3):369-76.
5. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997; 326(1):1–16.
6. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 1995;267(5203):1445-9.
7. Gerl R, Vaux DL. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*. 2005;26(2):263-70.
8. Matarrese P, Manganeli V, Garofalo T, Tinari A, Gambardella L; Ndebele K et al. Endosomal compartment contributes to the propagation of CD95/Fas-mediated signals in type II cells. *Biochem J*. 2008; 413(3):467-78.
9. Suzuki YJ, Nagase H, Wong CM, Kumar SV, Jain V, Park AM et al. Regulation of Bcl-xL expression in lung vascular smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36(6):678-87.
10. Cui Y, Zhu J, Wu R. Functional mapping for genetic control of programmed cell death. *Physiol Genomics*. 2006;25(3):458-69.
11. Guerra AN, Gavala ML, Chung HS, Bertics PJ. Nucleotide receptor signalling and the generation of reactive oxygen species. *Purinergic Signal*. 2007;3(1-2):39-51.

12. Leite HP, Sarni RS. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. *RevBrasNutrClin*. 2003; 18(2): 87-94.
13. Messmer UK, Brüne B. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem J*. 1996;319(1):299-305.
14. Yoshioka Y, Yamamuro A, Maeda S. Nitric oxide at a low concentration protects murine macrophage RAW264 cells against nitric oxide-induced death via cGMP signaling pathway. *Br J Pharmacol*. 2003; 139(1):28-34.
15. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007; 51(3):443-52.
16. Fernandes KPS, Mayer MPA, Ando ES, Ulbrich AG, Amarente-Mendes JGP, Russo M. Inhibition of interferon- $\gamma$ -induced nitric oxide production in endotoxin-activated macrophages by cytolethal distending toxin. *Oral MicrobiolImmunol*. 2008;23:360–6.
17. Reid MB. Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol Scand*.1998;162(3):401-9.
18. Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *RevBrasMed Esport*. 2004; 10(4): 308-13.
19. Cai BT, Yu B, Zhao JP, Zhang X. Exercises at different intensities and sequential changes of rat skeletal muscle cell apoptosis. *Nan Fang Yi Ke Da XueXueBao*. 2006;26(7):1017-29.