

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO
HUMANO

THIAGO GOMES HECK

RAZÃO ENTRE O CONTEÚDO EXTRACELULAR E INTRACELULAR
DE HSP70 COMO UM SINAL DE ALERTA IMUNOLÓGICO E
MARCADOR DE INTENSIDADE DE EXERCÍCIO.

PORTO ALEGRE

2011

THIAGO GOMES HECK

**RAZÃO ENTRE O CONTEÚDO EXTRACELULAR E INTRACELULAR
DE HSP70 COMO UM SINAL DE ALERTA IMUNOLÓGICO E
MARCADOR DE INTENSIDADE DE EXERCÍCIO.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Movimento Humano da Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência do Movimento Humano

Orientador: Prof. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr

Porto Alegre

2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a família, no sentido irrestrito da palavra, considerando aqueles que fazem parte da minha família, pelo amor e carinho de sempre. Obrigado.

AGRADECIMENTOS

As conquistas dos objetivos particulares nunca são alcançados de maneira individualista. Portanto, agradeço todos que, de alguma forma, foram importantes nesta etapa:

À família, pelo apoio inestimável, auxiliando com afeto e pela paciência nestes anos de estudo e ausência. Em especial minha mãe Maria Aparecida Gomes Heck, que soube aguentar por muitos anos a incerteza do convívio diário.

Ao meu irmão Bruno Lion, pelos ensinamentos, amizade e sinceridade na relação de irmão, que a distância jamais interrompeu.

Ao meu pai, que mesmo distante teve participação na formação da personalidade e de conduta.

Por toda a ajuda, do início ao final deste estudo, agradeço a Sofia Pizzato Scomazzon pela dedicação e empenho incansável nos experimentos, além do amor, carinho e paciência que deve como namorada.

A Profa. Claudia Ramos Rhoden, por me conceder a oportunidade de realização do mestrado, pelos ensinamentos que me foi passado que foram fundamentais nesta etapa de doutoramento.

Ao professor Pedro Dall'Ago, por despertar a curiosidade pela fisiologia no início de minha formação e pelo acompanhamento durante o mestrado.

Aos colegas de todos os laboratórios onde estive, especialmente os amigos Jadson Pereira Alves e Ramiro Barcos Nunes, Marcelo Petry e Roberto Damiani, grandes amigos.

Ao professor Alexandre Maslinkiewicz (Baby), que mostrou os caminhos a serem trilhados. As conquistas e épocas de trabalhos em conjunto sempre serão lembradas.

Aos professores desta instituição pelo exemplo e oportunidades durante este período. Especialmente aos professores Prof. Álvaro Reischak de Oliveira e Flavio Antônio de Souza Castro que sempre foram solícitos para atender aos chamados como aluno.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, especialmente pelo atendimento prestado Ana Lúcia Minor Larratúa e André Luís Carmo dos Santos.

Um abraço especial aos amigos dos quais que estive afastado, os Corvos e os Radioativos que me aguardem para as “comemorações”.

Aos colegas de laboratórios, pelo aprendizado, convívio e amizade: Gustavo, Cinthia, Ana, Mari, Vini, Aline, Nelson, Patrícias, Lino, Rossana, Tati, Angelas, Claudinha, Eder e Antônio. Cada um de vocês sabe a participação que teve. Eu também! Obrigado.

Agradeço especialmente aos amigos Profa. Mirna Stela Luwig e ao Prof. Remi Dama, pelo acolhimento nesta nova jornada em Ijuí, juntamente com o colega Maciel Bruxel. Obrigado.

Por fim, agradeço imensamente ao professor Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr por todos estes anos de ensino, orientação e amizade. Sem dúvida, o crescimento ao longo da vida vai estar sempre ligado aos aprendizados diários pelo convívio com esta pessoa, que além de excelente cientista, é um grande amigo.

SUMÁRIO

Conteúdo

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
A TEMPERATURA COMO UM DETERMINANTE DA SOBREVIVÊNCIA.....	15
A FEBRE COMO UMA RESPOSTA FISIOLÓGICA	19
HISTÓRICO DOS ESTUDOS DE RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO	22
RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO	24
FATORES DE TRANSCRIÇÃO DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO	26
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E HSP70	28
HSP70 EXTRACELULAR (eHSP70)	33
EXPRESSÃO DE HSP70 PELO EXERCÍCIO.....	36
HSP70 NO AUXÍLIO AO SISTEMA IMUNOLÓGICO	39
EXERCÍCIO, SISTEMA IMUNOLÓGICO E HSP70.....	44
OBJETIVOS.....	47
OBJETIVO GERAL.....	47
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
MATERIAIS E MÉTODOS	48

ANIMAIS	48
RESUMO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	50
PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO	51
DOSAGEM DE LACTATO	52
MEDIDA DA TEMPERATURA DOS ANIMAIS	52
DOSAGEM DE GLICOGÊNIO MUSCULAR	53
PREPARAÇÃO CELULAR DE LINFÓCITOS DE LINFONODOS MESENTÉRICOS DE RATOS	54
CULTURA DE LINFÓCITOS E TRATAMENTO COM CHOQUE TÉRMICO	55
CULTURA DE LINFÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO, EXPORTAÇÃO E DO mRNA DE HSP70 EM RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO	57
CULTURA DE LINFÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO	58
CULTURA DE LINFÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA EXPRESSÃO DE HSP70 EM RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO	60
PROTOCOLO DE <i>WESTERN BLOT</i>	61
EXPRESSÃO DOS GENES DE HSP70 POR RT-PCR EM TEMPO REAL	63
MEDIDA DA EXPORTAÇÃO DE HSP70	64
EXTRAÇÃO DE NÚCLEOS CELULARES E DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO TRANSCRICIONAL DO NF- κ B	65
IMUNOMICROSCOPIA ELETRÔNICA E DE LUZ COM HRP-DAB E IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FLUORESCÊNCIA PARA LINFÓCITOS EM SUSPENSÃO	67
IMUNOMICROSCOPIA ELETRÔNICA E DE LUZ COM HRP-DAB E IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FLUORESCÊNCIA PARA LINFÓCITOS EM SUSPENSÃO	67
ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
RESULTADOS	74
DISCUSSÃO	108
CONCLUSÃO	121

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 122

**ANEXO I-ARTIGO PUBLICADO: HSP70 EXPRESSION- DOES IT A NOVEL FATIGUE
SIGNALLING FACTOR FROM IMMUNE SYSTEM TO THE BRAIN?..... 142**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo hipotético proposto para compreensão dos efeitos da temperatura corporal nas capacidades fisiológicas de organismos ectotérmicos (adaptados de Morimoto et al, 1990).....	17
Figura 2. Relação entre o sistema imunológico e a intensidade de exercício (adaptado de Nieman, 1994)	46
Figura 3. Fluxograma resumindo as etapas experimentais deste estudo.....	50
Figura 4. Temperatura retal de ratos Wistar submetidos a protocolo de natação experimental.....	75
Figura 5. Concentração de lactato sanguíneo em ratos Wistar após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades.....	76
Figura 6. Concentração de glicogênio no músculo gastrocnêmio de ratos Wistar após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades.....	77
Figura 7 Expressão de mRNA de HSP72 e HSP73 após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos Wistar.	78
Figura 8. Expressão de mRNA de HSP72 e HSP73 após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos Wistar submetidos ao <u>choque térmico</u>	79
Figura 9. Expressão de mRNA de HSP72 e HSP73 após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos Wistar cultivados por 6 horas após serem submetidos ao choque térmico.	80
Figura 10. Conteúdo celular de HSP70 em linfócitos submetidos ao choque térmico, extraídos de ratos Wistar após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades.	82
Figura 11. Exportação de HSP70 induzida por choque térmico em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício físico de natação.	83
Figura 12. Relação entre a quantidade extracelular e intracelular de HSP70 induzida por choque térmico em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício físico de natação.....	84
Figura 13. Marcação na membrana com anticorpo fluorescente (FITC) anti-HSP70 demonstrando a exportação de HSP70 induzida por choque térmico em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício físico de natação.....	86

Figura 14 Marcação na membrana com anticorpo anti-HSP70 demonstrando a exportação de HSP70 via exossomos induzida por choque térmico em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício físico de natação.	88
Figura 15 Conteúdo celular de HSP70 em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos que realizaram não realizaram exercício de natação com a carga de (RE).....	90
Figura 16 Conteúdo celular de HSP70 em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos que realizaram exercício de natação com a carga de 2% (G2).	90
Figura 17 Conteúdo celular de HSP70 em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos que realizaram exercício de natação com a carga de 4% (G4).	91
Figura 18 Conteúdo celular de HSP70 em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos que realizaram exercício de natação com a carga de 6% (G6).	92
Figura 19 Conteúdo celular de HSP70 em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos que realizaram exercício de natação com a carga de 8% (G8).	93
Figura 20 Marcação celular com anticorpo fluorescente (FITC) anti-HSP70 demonstrando a localização celular de HSP70 induzida por choque térmico em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício físico de natação.....	95
Figura 21 Ativação do NF-KB em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos mantidos em repouso.....	97
Figura 22. Ativação do NF-KB em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos submetidos ao exercício de natação com carga de 2% do peso corporal.	97
Figura 23. Ativação do NF-KB em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos submetidos ao exercício de natação com carga de 4% do peso corporal.	98
Figura 24. Ativação do NF-KB em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos submetidos ao exercício de natação com carga de 6% do peso corporal.	99
Figura 25. Ativação do NF-KB em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos submetidos ao exercício de natação com carga de 8% do peso corporal.	100
Figura 26 Marcação celular com anticorpo fluorescente anti- subunidade p50 do NF-κB, demonstrando a localização celular de NF-κB induzida por choque térmico em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício físico de natação.	102
Figura 27 Marcação de linfócitos com anticorpo fluorescente anti- subunidade p50 do NF-kB e anti HSP70 após o exercício físico.....	104

Figura 28. Proliferação de linfócitos retirados de linfonodo mesentérico de ratos Wistar após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades.....	104
Figura 29 Proliferação de linfócitos submetidos ao choque térmico retirados de linfonodo mesentérico de ratos Wistar após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades.	105
Figura 30 Relação entre os níveis de HSP70 celular, exportação de HSP70, proliferação celular e ativação de NF- κ B nas diferentes intensidades de exercício em linfócitos mantidos a 37°C em banho-maria e por 6h em cultura a 37°C.	106
Figura 31 Relação entre os níveis de HSP70 celular, exportação de HSP70, proliferação celular e ativação de NF- κ B nas diferentes intensidades de exercício em linfócitos submetidos ao choque térmico a 42°C e permaneceram em cultura a 37°C por 6h.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

CD14	Do inglês, cluster of differentiation
CP-PG	Prostaglandina ciclopentenônica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
eHSP70	Proteína de choque térmico extracelular de 70kDa
HSP73	Proteína de choque térmico, constitutiva de 73 kDa
HSP	Proteína de choque térmico
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa (incluindo HSP72 e HSP73)
HSP72	Proteína de choque térmico, induzível de 72 kDa
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IFN- γ	Interferon-gamma
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
JNK	c-Jun quinase
LPS	lipopolissacarídeos de parede bacteriana
MHC	do inglês, major histocompatibility complex
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
MyD88	proteína resposta-primária de diferenciação mieloide inflamatória 88
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	Fator nuclear kappa B (do inglês, <i>nuclear factor-κB</i>)
NO	Óxido nítrico
PBS	Salina tamponada com fosfato (do inglês <i>phosphate buffer saline</i>)
RPMI 1640	Do inglês, Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SFB	Soro fetal bovino

TLR2	Receptor do tipo Toll (do inglês, <i>Toll-Like Receptor 2</i>)
TLR4	Receptor do tipo Toll (do inglês, <i>Toll-Like Receptor 4</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>tumor necrosis factor- α</i>)
VO ₂	Consumo de oxigênio

RESUMO

Organismos respondem a desafios fisiológicos, como o choque térmico e exercício físico, com um aumento rápido na expressão de alguns genes específicos, genes que codificam proteínas conhecidas como proteínas de choque térmico, em especial HSP70 (proteína de choque térmico de 70 kDa). Esta proteína tem funções citoprotetoras anti-inflamatórias quando localizadas no ambiente intracelular, mas, quando exportada para o meio extracelular (eHSP70), esta proteína desempenha funções pró-inflamatórias. Neste estudo foram avaliados os efeitos do choque térmico em linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício físico de natação. Tanto o exercício físico como o choque térmico foram capazes de induzir a síntese de HSP70 em linfócitos, sendo que o aumento do conteúdo celular de HSP70 (e migração para a região nuclear) foi relacionado com a inativação do fator nuclear NF- κ B (e manutenção deste fator de transcrição pró-inflamatório no citoplasma), além de diminuição da proliferação celular. Embora, este aumento de HSP70 intracelular (induzido pelo exercício e pelo choque térmico) seja crescente conforme a intensidade, os resultados demonstram que há um limite de intensidade para este efeito, pois o conteúdo intracelular de HSP70 foi limitado pela carga mais alta de exercício. Adicionalmente, a alta intensidade de exercício foi associada ao aumento de eHSP70, o que modificou a relação intra-para-extracelular de HSP70 em linfócitos. A relação eHSP70/HSP70 também foi aumentada em resposta ao choque térmico, mas exacerbada pela execução prévia de exercício em alta intensidade. Como esta relação foi um indicativo de limites de intensidades de exercício, este trabalho sugere o uso da HSP70 com um marcador de intensidade de exercício, fundamentalmente utilizando células imunológicas como parâmetro devido a possibilidade de as mesmas usarem a HSP70 como sinal de alerta para o organismo.

ABSTRACT

Living organisms respond to physiological challenges, such as heat shock treatment and/or exercise with a rapid and marked increase in some of some specific gene expression: The heat-shock response that occurs in many cells inducing the 70-kDa Heat-Shock Protein (HSP70) synthesis. HSP70 has anti-inflammatory cytoprotective functions when located at the intracellular environment. Once HSP70 can be released to extracellular environment, the extracellular (eHSP70) plays pro-inflammatory functions. This study evaluated the effects of heat shock in lymphocytes from mesenteric lymph nodes taken from rats previously subjected to different intensities of swimming exercise. Both exercise and heat shock were able to induce the HSP70 synthesis in lymphocytes, and increased cellular content of HSP70 and the translocation of HSP70 to the nuclear region was associated with the inactivation of NF- κ B, as observed in the maintenance of this pro-inflammatory transcription factor in the cytoplasm, that may be related to cell proliferation decrease. Although this effect of exercise on HSP70 expression was related with exercise intensity, this study showed that there exist a threshold for exercise-induced HSP70 expression, since higher exercise loads were not able to increase HSP70 synthesis further in lymphocytes. Additionally, high-intensity exercise was associated to eHSP70 increase and enhanced intra-to-extracellular HSP70 ratio in lymphocytes. The eHSP70/HSP70 ratio also was also increased in response to heat shock, but higher levels was observed if the rat was submitted to previous high-intensity exercise session. These data suggest that HSP70 may be a new exercise intensity marker, primarily using immune cells because of the possibility of this cells use HSP70 as a danger signal to the whole body.

INTRODUÇÃO

A TEMPERATURA COMO DETERMINANTE DA SOBREVIVÊNCIA

Ao observar-se a maneira pela qual ocorre a distribuição das espécies em nosso planeta é possível perceber-se que esta distribuição reflete os gradientes de temperatura do ambiente. Estes descontínuos de temperatura, tanto temporal quanto espacial, implicam em adaptações de comportamento em todo organismo vivo, pois ao longo do processo evolutivo cada espécie encontra um determinado nicho térmico no qual se desenvolve e sobrevive (Hochachka, 2002).

Muitas vezes, a temperatura impõe limites restritos nos quais a vida pode ocorrer e prosperar, essencialmente por desafiar a fisiologia de cada organismo. Em contrapartida, adaptações em estruturas básicas de macromoléculas e mudanças nas velocidades de reações bioquímicas ocorrem em resposta ao desafio da ambientação em diferentes temperaturas. Mas, como pode a temperatura gerar perturbações estruturais e funcionais em um organismo? Como ocorre a adaptação diante desse desafio térmico?

Um aspecto essencial a ser considerado é a identificação do tipo de relação que cada organismo é capaz de ter com o ambiente que o cerca, ou seja, até que ponto um organismo pode manter sua temperatura corporal e continuar funcionando independente do ambiente externo. Se um organismo é capaz de não transferir as mudanças do ambiente externo ao ambiente interno, no que diz respeito à temperatura, certamente trata-se de uma espécie menos suscetível a distúrbios na homeostase causados por mudanças na temperatura ambiente. Organismos que têm a sua temperatura interna variando de acordo com a temperatura de seu *milieu*, seja ele o ar ou a água, são chamados de ectotérmicos, e, normalmente, buscam o ambiente adequado para manter a temperatura interna estável, enquanto são classificados como homeotérmicos aqueles seres vivos capazes de manter estável sua temperatura corporal, o que pode ocorrer por produção interna de calor (endotérmicos). Espécies heterotérmicas são aquelas que usam sua capacidade de

regulação da temperatura corporal para escolher o ponto ideal diante as condições ambientais (Hochachka, 2002).

Diante dessa variabilidade entre as espécies, quanto ao manejo da relação entre o ambiente interno e o externo (mantendo a temperatura em foco), é notável a enorme diferença na faixa de temperatura ambiental a qual cada organismo pode tolerar. Enquanto algumas espécies (estenotérmicos) suportam apenas uma faixa estreita de temperatura (variações de no máximo 4°C), outras espécies (euritérmicas) suportam variações diárias de temperatura tão amplas quanto 30°C (Hochachka, 2002).

O ambiente interno dos organismos vivos (*milieu interior*) não permanece em estado de constante equilíbrio, pois estes são influenciados e desafiados pelo ambiente ao longo do tempo e do espaço. Alterações ambientais extremas podem gerar estresse ao organismo, causando danos irreparáveis e até a morte, enquanto alterações moderadas podem modificar capacidades fisiológicas e influenciar no crescimento, reprodução ou na interatividade social. Portanto, não surpreendente, é o fato de muitos organismos desenvolverem ajustes diante destas alterações de temperatura para neutralizar o impacto funcional. Estes ajustes podem ter um efeito na evolução das espécies muito pronunciado e, portanto, podem ser estudados por diferentes perspectivas, não se esquecendo contudo, o fato de que a resposta ao desafio térmico não depende somente de condições meteorológicas, mas também do comportamento, da morfologia e da fisiologia particular de cada organismo (Morimoto *et al.*, 1990; Hochachka, 2002).

Neste contexto, destaca-se que não são necessárias mudanças de temperatura muito extremas para promover adaptações fisiológicas nos mais diversos organismos. A mudança de temperatura de apenas 1°C pode ser considerada um evento importante porque pode mudar reações biológicas modificando-as em 10% (acima ou abaixo do metabolismo basal), influenciando o ritmo circadiano em muitas espécies, modificando o comportamento alimentar, gerando a transposição de um nicho para outro em uma espécie e fundamentalmente, tema a ser discutido ao longo deste texto, a mudança de temperatura pode desencadear modificações fisiológicas conhecidas como a resposta ao choque térmico.

A regulação da temperatura ou a adaptação às modificações de temperatura são cruciais para todos os organismos vivos. A faixa de temperatura em que organismos ectotérmicos vivem é geralmente chamada de zona de tolerância. Nesta zona, as capacidades fisiológicas de um organismo podem aumentar com o aumento da temperatura corporal até um nível ótimo, mas ocorre uma rápida diminuição destas capacidades quando ultrapassada este ponto ótimo na relação entre a temperatura e as reações biológicas internas (figura 1).

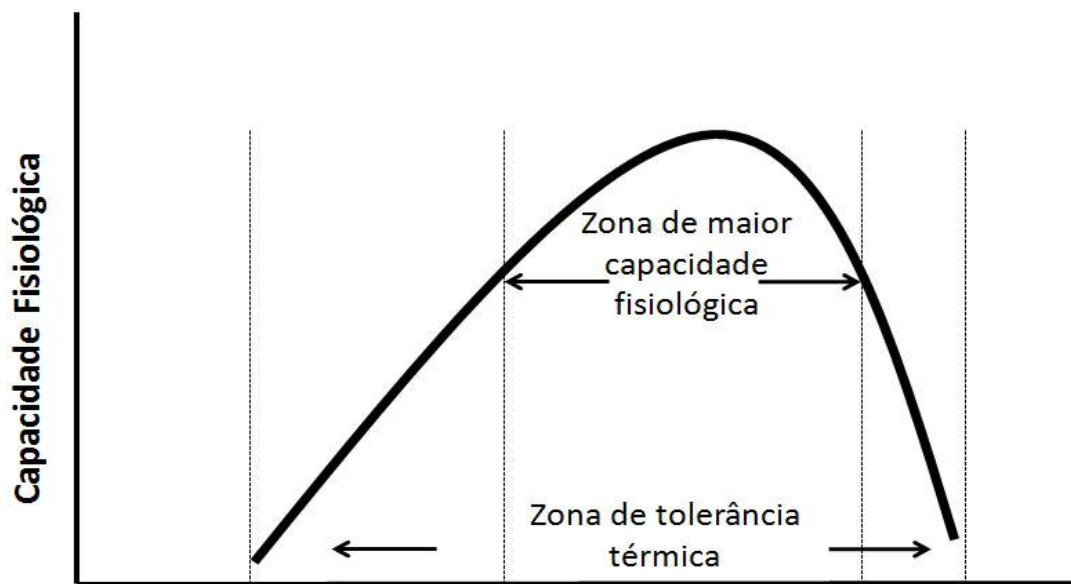


Figura 1. Modelo hipotético proposto para compreensão dos efeitos da temperatura corporal nas capacidades fisiológicas de organismos ectotérmicos (adaptados de Morimoto et al, 1990).

Deste modo, pode-se dizer que a influência da temperatura na fisiologia de um organismo ocorre por duas vias: a primeira envolve a regulação da temperatura corporal (termorregulação) que permite ao organismo um maior controle sobre suas capacidades fisiológicas que sofrem influência da temperatura, somado à capacidade de modificar o comportamento com a finalidade de evitar ambientes ou situações de grande produção de calor. A segunda envolve a reorganização do organismo de acordo com a sua sensibilidade ao estresse térmico, resultando em soluções de curto prazo (aclimatação) e de longo prazo de caráter evolutivo (adaptação).

Mamíferos (endotérmicos) utilizam o metabolismo na regulação da temperatura interna, enquanto outras espécies (ectotérmicas) utilizam a mudança da temperatura como meio de modificações ou adequações fisiológicas para influenciar no comportamento (Morimoto *et al.*, 1990).

Em algumas situações, as habilidades termorregulatórias dos organismos são inadequadas ou inapropriadas, mas do mesmo modo, o ajuste da sensibilidade de um sistema fisiológico pode neutralizar o efeito das variações de temperatura nas capacidades fisiológicas e no comportamento. Podem-se distinguir as adaptações entre as que afetam a sobrevivência diante de temperaturas extremas (adaptações de resistência) e aquelas adaptações que afetam as capacidades fisiológicas diante de temperaturas não extremas (adaptações de capacidade). Para o entendimento dos tipos de adaptações, torna-se crucial observar também a escala temporal na qual as adaptações ocorrem. Uma adaptação que leva uma semana para ocorrer parece ser inapropriada para uma situação de desafio tão curta quanto poucas horas. Outro aspecto importante é a magnitude desta adaptação, onde a mobilização de grande parte do organismo diante de um estresse pode representar uma má adaptação diante de um desafio (Hochachka, 2002).

De maneira mais pontual, o aumento transitório de tolerância ao choque térmico em um organismo pode ocorrer por uma pré-exposição do mesmo a um desafio térmico não letal. Este fenômeno não tem suas bases fisiológicas completamente compreendidas, mas, certamente, mobiliza uma vasta lista de adaptações celulares que envolvem a síntese de algumas proteínas e a repressão da síntese outras proteínas (Morimoto *et al.*, 1990). Neste sentido, sobre uma perspectiva evolucionista, a resposta fisiológica ao estresse térmico tem dois aspectos marcantes: Primeiramente o entendimento de que o estresse térmico é um desafio comum e universal entre as espécies. E, não menos importante, o entendimento de que existem proteínas que desempenham funções fundamentais nos processos fisiológicos naturais, mas que desempenham funções fundamentais diferenciadas somente quando necessário, representando uma economia de energia para cada célula do organismo (Lindquist e Craig, 1988; Morimoto *et al.*, 1990; Feder e Hofmann, 1999).

A FEBRE COMO RESPOSTA FISIOLÓGICA

Durante a idade média, acreditava-se que questões espirituais estavam ligadas a produção de febre no corpo humano. Posteriormente os estudos de Willian Harvey e Claude Bernard apresentaram subsídios ao entendimento de que o sistema vascular participava da distribuição de calor pelo corpo humano. No entanto, a data precisa do início do acompanhamento da temperatura do corpo como um dado clínico é incerta. Embora Galileo Galilei já tivesse desenvolvido um termômetro artesanal em 1592, seu uso na prática da medicina só foi assimilado em 1868 quando Carl Reinhold August Wunderlich publicou seu trabalho “*The Course of Temperature in Diseases*” (*Das Verhalten der Eigenwärme in Krankheiten*, no idioma original), demonstrando a temperatura corporal normal 98.6°F (37.0°C). Wunderlich estabeleceu ainda 100.4°F (38.0°C) como sendo o limite superior da temperatura corporal, estabelecendo o primeiro dado quantitativo sobre o fenômeno chamado febre, com um estudo inigualável, pois se estima que seus dados foram baseados em 25 indivíduos e mais de 1 milhão de medidas) (Mackowiak, 1998).

Alterações na temperatura corporal podem ser definidas simplesmente pelas alterações no armazenamento de calor no corpo, podendo ser positivo ou negativo, ou seja se o corpo produz mais calor do que é capaz de dissipar, considera-se um efeito positivo no sentido de ganho de calor. Neste aspecto o exercício físico representa um fator em potencial para o aumento da temperatura corporal, visto que somente 20% da energia gerada pelo metabolismo durante o exercício resulta em trabalho (Armstrong, 2003).

Para manter a temperatura corporal, o organismo de humanos e de outros mamíferos dispõe de regiões de controle central, como a área pré-óptica do hipotálamo anterior em humanos, que funciona através de informações aferentes e de sinalização eferente interagindo com outros sistemas como o sistema nervoso autônomo simpático. Três tipos de neurônios coordenam as respostas fisiológicas ao calor, causando sudorese e vasodilatação. Neurônios sensíveis ao calor (ativados em temperaturas acima de 37°C) são responsáveis por acionar estas respostas. Neurônios sensíveis ao frio aumentam sua frequência de impulsos quando a

temperatura corporal está abaixo do ajustado pelo próprio hipotálamo. E, por último, neurônios não sensíveis a temperatura modulam as respostas dos neurônios descritos anteriormente, integrando as informações centrais com as informações oriundas da periferia por ter projeções neuronais via dendritos em áreas de inervação de neurônios aferentes. Deste modo, é possível compreender a participação das respostas termorregulatórias durante o exercício, sendo 90% dependente da temperatura interna (temperatura central) e apenas 10% dependente da temperatura externa (temperatura cutânea), durante o exercício (Armstrong, 2003).

Embora os seres humanos sejam seres migratórios, que se aproximaram ou se afastaram das regiões dos trópicos ao longo de milhares de anos, os humanos são melhores ambientados aos ambientes quentes quando comparados aos ambientes frios, regulando a temperatura interna entre 35 e 39°C nas mais diversificadas situações, conforme dados clínicos que apontam a variação normal de temperatura humana de 35,67°C a 38,27°C (Mackowiak *et al.*, 1997). Por exemplo, as temperaturas mais baixas no ser humano podem ser observadas durante o sono, enquanto as mais altas ocorrem na fase mais ativa do dia, entre as 17 e as 19 h, sendo que, normalmente, esta variação ocorre entre 0,5 e 1°C. Esta variação circadiana na temperatura corporal persiste mesmo na ausência de exposição a luz solar, o que sugere um parâmetro estreitamente regulado pelo organismo (Armstrong, 2003).

Embora a febre possa ser definida como qualquer elevação de temperatura corporal, essa definição pode gerar confusão com o conceito de hipertermia. Na febre, ocorre a elevação do ponto de regulação térmico, fazendo com que o organismo produza mais calor e ao mesmo tempo perca menos calor para o ambiente para elevar a temperatura corporal até o novo ponto de regulação. A hipertermia ocorre quando há aumento da temperatura corporal sem que o ponto de regulação térmico seja alterado. Mackowiack define a febre como “estado elevado de temperatura corporal central, no qual geralmente, mas não necessariamente, é uma resposta do sistema de defesa de um organismo multicelular (hospedeiro) diante de invasores, sejam organismos vivos ou partículas inanimadas reconhecidas como patógenos pelo hospedeiro”. Portanto a febre, que é um componente da resposta febril, é um evento mais complexo do que o simples aumento de temperatura corporal. Evidências muito antigas indicam que a febre pode ter efeitos benéficos no organismo, aumentando a resistência de animais a infecções. Um estudo clássico envolvendo

répteis em submetidos a modelo experimental de infecção, Bernheim and Kluger demonstraram uma correlação direta entre a supressão da febre e a mortalidade destes animais (Mackowiak, 1998). Também em mamíferos, a febre está associada à resistência de camundongos ao vírus herpes simplex, poliovírus e infecção por *Cryptococcus neoformans* (entre outros), embora efeito contrário seja observado no combate a infecção por *Streptococcus pneumoniae*. Dados clínicos também são observados em pacientes com bacteremia gram-negativa, onde a temperatura máxima observada está correlacionada com a sobrevivência dos indivíduos (Mackowiak *et al.*, 1997; Mackowiak, 1998; , 2005).

O aumento da temperatura corporal na febre ocorre pela produção endógena de agentes pirógenos que elevam o ponto de regulação de temperatura de um organismo. Por outro lado, pode-se observar que o simples fato de modificar o ambiente ao qual um animal está acostumado é suficiente para gerar aumento de temperatura corporal de até 2°C e esta resposta é gerada pela liberação dos mesmos pirógenos endógenos que são liberados também em condição febril. Esta semelhança entre o aumento de temperatura corporal sem condições de infecções e a condição de febre induzida por uma infecção bacteriana ou viral reporta a importância da própria capacidade de cada organismo em desenvolver a febre diante de desafios imunológicos. Neste contexto, a capacidade de produzir febre pode ser considerada uma adaptação evolutiva que representa um aumento na capacidade de defesa do organismo quando hospedeiro de um agente infeccioso. Este conceito se reforça na improbabilidade de um organismo (vertebrado ou invertebrado) ser apto a desenvolver estratégias fisiológicas que o permitam aumentar o custo metabólico e manter essa demanda energética elevada por longo período de tempo (normalmente horas) sem que estas mudanças ocorram no intuito de beneficiar o próprio organismo, quando, por exemplo, um organismo mantém o corpo com 1 ou 2°C acima do normal na situação febril.

Neste contexto, embora certas respostas do próprio organismo possam ser potencialmente danosas ao mesmo, como em situações inflamatórias, geralmente a resposta pró-inflamatória (presente em condições febris ou diante de desafios metabólicos) é essencial para sobrevivência em ambientes hostis. Adicionalmente, estudos têm demonstrado que pequenas elevações na temperatura corporal, similares às observadas durante a febre, resultam em melhora das respostas imunológicas.

HISTÓRICO DOS ESTUDOS DE RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO

Possivelmente, o trabalho mais antigo relatando a resposta ao choque térmico seja o estudo de Goldschmidt (1935), com *Drosophila*, no qual foi observado o efeito do estresse na expressão de genes específicos em pontos cruciais do desenvolvimento, levando a formação de cópias de fenótipos celulares específicos. Mas, especificamente em resposta ao choque térmico, Ferruccio Ritossa, um geneticista italiano, é reconhecido como sendo o primeiro a descrever a resposta ao choque térmico. Sua descoberta tem início durante uma disciplina na qual o Prof. Ritossa decide trabalhar com *Drosophila*, a despeito de ser considerado uma subclasse de pesquisador por estar trabalhando com esta espécie. Utilizando glândulas salivares de *Drosophila buskii*, Ritossa inicia seus estudos com autorradiografia com trício para descrever os tipos de ácidos nucleicos que são sintetizados nestas glândulas salivares. No meio de suas leituras das recentes publicações sobre ácidos nucleicos (especificamente RNA) em outras espécies, um membro do grupo de pesquisa de Ritossa aumentou a temperatura da incubação da estufa das glândulas salivares (acidentalmente). Este evento levou à observação da síntese de uma nova classe de RNA nessas glândulas, impressionantemente sintetizados em apenas 2 minutos. Ao lembrar-se das leituras prévias que o informavam sobre a influência do calor na estrutura de água congelada que circunda as proteínas da cadeia de transporte de elétrons, interferindo assim na fosforilação oxidativa, Ritossa realiza testes com outras situações como o desacoplamento de ATPases, descrevendo que a hipóxia levaria a expressão dos mesmo genes (Ritossa, 1996).

O artigo escrito por Ritossa teve a ajuda de colegas do próprio laboratório e de laboratórios vizinhos que, no entanto, não se candidataram à condição de coautores do manuscrito, que foi inicialmente rejeitado por editores das revistas científicas mais consideradas da época por ser considerada uma informação científica irrelevante. O artigo foi finalmente publicado como um resumo expandido (*New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in Drosophila, Experientia, 18: 571-573, 1962.*) e a resposta ao choque térmico foi confirmada pelo próprio Ritossa em outras espécies de *Drosophila*, em outros tecidos e em diferentes fases de desenvolvimento, essencialmente investigando a anaerobiose como um fator desencadeador. Considerado o pioneiro na pesquisa da resposta ao choque térmico, a sua

descoberta acidental foi comentada pelo próprio autor (Ritossa, 1996) e pelo editor chefe da revista científica mais relacionada ao choque térmico, *Cell Stress and Chaperones*, que descreveu esta descoberta acidental como sendo uma clara demonstração de aplicabilidade dos dizeres de outro grande cientista, Luis Pasteur: “o acaso favorece a mente preparada”.

Vinte anos mais tarde ocorreu o isolamento do primeiro mRNA de proteínas de choque térmico, em 1982. Ao longo deste período, ocorreram descobertas de respostas celulares semelhantes em bactérias, em células de mamíferos cultivadas, em leveduras e em plantas, culminado em um encontro de pesquisadores denominado “Choque Térmico: da bactéria ao homem”, em 1982. Neste período as funções das proteínas de choque térmico permaneciam incompreendidas e os detalhes da regulação da resposta ao choque térmico começavam a emergir (Calderwood, 2007).

RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO

Organismos vivos respondem a condições desfavoráveis como o choque térmico (além de outras situações desfavoráveis) com um aumento rápido, de grande magnitude e transitório na taxa de expressão de alguns genes específicos, genes que codificam proteínas conhecidas como proteínas de choque térmico. A transcrição de proteínas diante de choque térmico respeitam as considerações da termodinâmica, onde as proteínas que estão em estagio de dobramento estão imersa em ambiente aquoso também sob modificação conformacional. Toda a informação necessária para o dobramento correto de uma proteína esta na sua sequencia de aminoácidos, sua estrutura primária. A mudança na energia, que agora favorece a mudança de conformação das proteínas envolve interações tanto entre proteínas, como entre a água e as proteínas. Em outras palavras, as forças termodinâmicas são necessárias e suficientes para formar proteínas, passando de estruturas primárias, formações incompletas, ou até mesmo a formação de proteínas funcionais. Esta teoria premiou Christian Anfisen com o prêmio Nobel de (1915-1916) (Hochachka, 2002).

Neste contexto, proteínas desnaturadas são recuperadas por condições que favoreçam a estrutura natural das mesmas, inclusive recuperado atividades catalíticas de enzimas. Portanto, modificações na temperatura podem gerar novas estruturas proteicas, com novas funções, a partir de aminoácidos disponíveis no ambiente celular e o número de combinações possíveis é praticamente ilimitado. No entanto, estes dados criam um paradigma entre a espontaneidade na formação de proteínas e a necessidade de organização funcional de uma célula para corresponder a esta nova demanda. Embora esta perspectiva termodinâmica esteja correta, simplificar os eventos de síntese proteica diante de um desafio térmico pode representar um desconhecimento sobre os eventos complexos que ocorrem no ambiente intracelular durante o aumento da temperatura. Estes eventos extremamente complexos e organizados conhecidos como resposta ao choque térmico (Lindquist e Craig, 1988; Van Eden e Young, 1996).

Uma das maiores descobertas bioquímicas na biologia celular foi a identificação de chaperonas moleculares, estruturas proteicas diversificadas que desempenham funções essenciais

na correção do processo de formação de proteínas, além de auxiliar na compartimentalização das mesmas. Na essência, as chaperonas moleculares permitem que a energia termodinâmica tenham seus efeitos sobre a síntese proteica no ambiente celular. A presença destas chaperonas em bactérias e em organismos complexos representa o quão genérica possa ser esta resposta a temperatura nos seres vivos. Tendo em vista que não somente a temperatura é capaz de aumentar a atividade das chaperonas celulares, estas proteínas também são conhecidas como proteínas do estresse, por responder a uma margem muito grande de estímulos (Downes *et al.*, 1999). Cabe salientar que a presença de chaperonas moleculares é necessária também em condições normais, não somente em situações adversas (Morimoto *et al.*, 1990; Calderwood, 2007).

São raros os casos de organismos que não respondem ao choque térmico com aumento na expressão de chaperonas moleculares. *Hydra oligactis* um estenotérmico cnidário adaptado a ambientes frios não apresenta esta resposta diante de um choque térmico subletal. Devido a esta inabilidade, esta espécie é encontrada somente longe de ambientes que possam apresentar qualquer tipo de estresse térmico e os mecanismos pelos quais esta espécie é incapaz de produzir esta resposta clássica ao choque térmico, a síntese de chaperonas moleculares, ainda é desconhecida embora haja evidências de que a instabilidade no mRNA de uma chaperona molecular de 70 kDa seja a razão para a inexistência desta habilidade (Hochachka, 2002).

Um segundo exemplo de resposta ao choque térmico também esta em animais estenotérmicos adaptados a ambientes frios. Peixes que vivem em ambientes próximos a 0°C morrem em águas a 4°C. Nestes casos extremos, a resposta ao choque térmico aparentemente foi perdida ao longo da evolução em milhares de anos, pela existência em ambiente com temperatura estável (Hochachka, 2002).

Nestes exemplos de ausência de resposta ao choque térmico, as chaperonas moleculares são constitutivamente expressas, mas não aumentam a sua síntese e atividade em resposta ao aumento de temperatura. Portanto fica evidente a importância destas proteínas em condições basais, mas fundamentalmente diante de desafios ambientais.

FATORES DE TRANSCRIÇÃO DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

A habilidade de o organismo responder apropriada e rapidamente a desafios fisiológicos impostos pelo ambiente ou às mudanças extremas de metabolismo é uma característica essencial que permite a sobrevivência do mesmo. Existem muitas formas de estresse ao organismo que resultam em atividade de transcrição de genes específicos e os produtos desses genes, por sua vez, geralmente estão associados ao auxílio ao organismo diante deste desafio imposto. Neste sentido, a síntese de HSPs confere proteção e tolerância aos mais diversos desafios, sendo que, em células eucarióticas, a transcrição de genes de resposta ao choque térmico é regulada por uma família de proteínas ligantes ao DNA altamente conservadas na evolução das espécies, chamadas fator de transcrição de proteínas de choque térmico, os HSFs. (HSF, do inglês *Heat Shock Factor*) (Morimoto *et al.*, 1992).

O nível de regulação da resposta ao choque térmico *per se* possui caráter evolutivo. Enquanto insetos (*Drosophila melanogaster*) e leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) possuem apenas um tipo de HSF, dois genes já foram descritos em roedores (HSF1 e HSF2) e pelo menos três isoformas de HSFs em humanos (HSF1, HSF2 e HSF4) (Sarge *et al.*, 1991; Kroeger e Morimoto, 1994; Sistonen *et al.*, 1994; Nakai *et al.*, 1997) e em aves (HSF1, HSF2 e HSF3) (Nakai e Morimoto, 1993).

Quando comparadas as estruturas das isoformas de HSFs em vertebrados de uma mesma espécie, a sequência de aminoácidos é idêntica em pelo menos 40%, como por exemplo, a comparação entre o HSF1 e o HSF2 de camundongos (Sarge *et al.*, 1991). Quando comparados entre espécies, a homologia pode ser de até 92% quando, por exemplo, é feita a comparação entre o HSF1 de humanos com o de roedores e de aves. Do mesmo modo, a comparação entre o HSF2 de humanos e o de camundongos revela a homologia de 95%. Portanto trata-se de um sistema de regulação de transcrição gênica altamente conservada entre as espécies. Complementarmente, verifica-se a existência de regiões específicas como a região de ligação ao DNA e a porção de oligomerização idênticas em todas as isoformas de HSFs, reforçando a necessidade de conservação destas estruturas em diferentes organismos (Cotto e Morimoto, 1999).

Mesmo compreendendo o fato de que os HSFs são importantes na homeostasia celular, muito ainda se discute sobre qual a razão para a existência de múltiplos HSFs. Uma possibilidade investigada é de que organismos mais complexos poderiam utilizar múltiplos HSFs para responder aos mais diversos desafios fisiológicos e portando vencer o processo evolutivo enfrentando as adversidades ambientais. Neste sentido, a resposta pode estar na diferença entre o HSF1 e o HSF2, que podem ser ativados por desafios celulares distintos (Sistonen *et al.*, 1992; Sistonen *et al.*, 1994). Enquanto o HSF1 e HSF2 são encontrados em todas as células, o HSF4 parece ser específico em algumas células como os neurônios, células do músculo cardíaco e o esquelético, além de apresentar características repressoras da resposta ao choque térmico, sendo um regulador negativo (Nakai *et al.*, 1997).

Outras diferenças entre os HSFs são observadas em diversos modelos experimentais. Em linhagens celulares modificadas como a eritroleucemia K562 são observadas as diferenças entre o HSF1 e o HSF2, onde o primeiro é ativado em segundos diante de situações de estresse, e esta resposta também é atenuada rapidamente, enquanto que o segundo tem um período de latência, entre o evento desencadeador e a resposta, tão longo quanto 24 horas mas permanece ativado até 72 horas depois, demonstrando uma sinergia entre o HSF1 e o HSF2 na resposta celular ao estresse (Sistonen *et al.*, 1994).

Enquanto em condições basais o HSF1 é mantido como um monômero latente, após o choque térmico em células cada HSF1 se associa a outras duas moléculas idênticas formando um homotrímero de HSF1. De maneira distinta, o HSF2 e o HSF3 são encontrados na forma dimerizada em situações basais e ocorre também a trimerização destes fatores de transcrição diante de um choque térmico (Theodorakis *et al.*, 1989; Nakai e Morimoto, 1993).

PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E HSP70

Proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*-HSPs) são proteínas altamente conservadas durante a evolução das espécies e são encontradas em organismos eucarióticos e procarióticos. A primeira demonstração da indução celular de HSP, em resposta a um estresse celular, foi relatada em 1962 por Ritossa, quando observou o surgimento de um novo padrão de espessamento cromossomal em células de glândulas salivares de *Drosophila buskii*, fato que representava a transcrição para a síntese de HSPs após a exposição celular a temperaturas altas. No entanto, o estabelecimento do termo HSP ocorreu em 1974 (Tissieres *et al.*, 1974; Johnson e Fleshner, 2006).

As HSPs podem ser agrupadas de acordo com suas massas moleculares em famílias (HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e HSP30). A família mais conservada e estudada é a de peso molecular de aproximadamente 70 kDa (HSP70). Embora existam a forma mitocondrial de 75 kDa (HSP75) e uma forma de 78 kDa encontrada no retículo endoplasmático (GRP 78), a família das HSP70 é fundamentalmente representada pelas formas constitutiva de 73 kDa (HSC70 ou HSP73) e induzível de 72 kDa (HSP70 ou HSP72). A forma constitutiva é sintetizada na maioria das células e é somente induzida de maneira moderada, pois é constitutivamente expressa no citoplasma dentro de condições basais (Asea, 2005). Por outro lado, a forma induzível esta presente em menores quantidades nas células e pode ser rapidamente sintetizada no citoplasma. Rotineiramente, a literatura ao relatar sobre a indução desta proteína frente a alguma situação utiliza-se do termo unificado HSP70 abrangendo as duas formas, constitutiva e induzível. Ao longo deste texto, será usado o termo HSP70 como um coletivo de proteínas de choque térmico que abrange, sem necessidade de distinção, as formas constitutiva (73 kDa) e induzível(72 kDa). Quando houver necessidade de distinção, estas serão chamadas respectivamente de HSP73 e HSP72.

A HSP70 contém duas principais regiões estruturais: o domínio N-terminal, também referido como domínio ATPase, que é composto por aminoácidos formando uma estrutura de 45kd, e o domínio C-terminal que é composto por uma região (15 a 18kd) de ligação a substratos

e uma região carboxiterminal de 10 kDa (Erbse *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006). As regiões N e C terminal são regiões de extrema relevância na ligação a antígenos, deste modo auxiliando na resposta imunológica (Asea, 2005). Existem evidências de que o ATP possa estar envolvido na função da HSP70 pois a observação de uma forma homóloga da HSP70 em bactérias, a proteína chamada DnaK, apresenta uma baixa atividade ATPase. Sequencialmente, foi demonstrado a mesma atividade enzimática desta proteína em HSP70 de mamíferos (Van Eden e Young, 1996; Calderwood, 2007).

Interessantemente, o ATP, em concentrações micromolares, é capaz de causar uma rápida e expressiva saída da HSP70 do núcleo e do nucléolo enquanto substâncias análogas ao ATP não hidrolisáveis não causam esse mesmo efeito, sendo, portanto, a hidrólise do ATP um evento celular necessário para o deslocamento da HSP70 de seu substrato. Entretanto, baixas taxas de hidrólise de ATP podem ser observadas experimentalmente com HSP70 purificada, como por exemplo, um evento de hidrólise de ATP por molécula de HSP70 por minuto. Estes resultados sugerem que de tempos em tempos ocorre a hidrólise de uma molécula de ATP pela HSP70 para diminuir a afinidade desta proteína pelo substrato que está ligado ao sítio (Morimoto *et al.*, 1990).

Embora a descoberta das HSPs tenha ocorrido sob choque térmico, outros estímulos estressores como metais pesados, radiação UV, análogos de aminoácidos, infecção por bactérias ou por parasitas, inflamação, drogas citostáticas, inibidores da COX, ácido acetil salicílico, estresse oxidativo, além de agentes fisiológicos como fatores de crescimento, a diferenciação celular e o desenvolvimento de tecidos podem induzir a expressão destas proteínas (Lindquist e Craig, 1988; Morimoto *et al.*, 1990; Van Eden e Young, 1996; Locke e Noble, 2002; Mayer e Brown, 2004).

Primeiramente, as HSPs foram descritas pela sua ação de chaperona molecular, devido à capacidade de impedir a agregação de proteínas, auxiliando o remodelamento e a manutenção de proteínas estruturais, auxiliar no transporte de proteínas através da membrana, a degradação de proteínas instáveis e o remodelando proteínas desnaturadas (Johnson e Fleshner, 2006). Além disso, a expressão intracelular de HSP70 está associada à citoproteção e a mecanismos anti-

apoptóticos, reprimindo a expressão de genes e modulando a progressão do ciclo celular (Beere, 2005).

O evento conhecido como apoptose celular é mediado pela ação de caspases (cisteinil aspartato protease específica) através das vias intrínseca e extrínseca: a primeira caracteriza-se pela liberação de fatores pró-apoptóticos da mitocôndria para o citossol, enquanto que a segunda via diz respeito a ligação de sinalizadores apoptóticos em receptores específicos na membrana celular. A atividade antiapoptótica da HSP70 na via intrínseca deve-se a inibição de atividade proteolítica e da inibição de caspases, que resulta em inibição de múltiplas cascatas de sinalização intracelular que levam a apoptose. Além disso, a permeabilidade a proteína Bcl-2 na membrana mitocondrial sofre a interferência da HSP70 que impede a liberação deste fator apoptogênico. A interrupção da cascata de sinalização intracelular via JNK, NF- κ B e AKT pela HSP70 são um mecanismos descritos de inibição de apoptose, quando esta é induzida por elementos extracelulares ligados a receptores específicos na membrana extracelular (Beere, 2004).

Além da ação clássica de chaperona intracelular descrita acima, a HSP70 apresenta um efeito intracelular que merece um maior destaque: a inibição do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B). A inibição deste fator de transcrição pode representar profundas implicações no que diz respeito ao sistema imunológico, em processos inflamatórios, bem como em fatores destacados acima como a regulação da sobrevivência celular e a apoptose.

A HSP70 é capaz de inibir a atividade do NF- κ B em diferentes níveis. Primeiramente, ocorre a inibição da fosforilação do inibidor da κ B (I κ Bs), visto que em células submetidas ao choque térmico a HSP70 liga-se a subunidade I κ B kinase gamma (IKK γ), inibindo assim a indução de apoptose pela produção de Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Ran *et al.*, 2004).

Neste sentido, a hipótese de que a HSP70 represente uma proteína supressora da atividade do NF- κ B vem sendo reafirmada pelo número crescente de estudos onde ocorre a indução de HSP70 intencionalmente para verificar seu efeito inibitório sobre reações inflamatórias, como a ativação de fosfolipase A2 (que é estimulado pelo TNF- α) (Jaattela, 1993), como a síntese de óxido nítrico (NO - produzido pela atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível, onde a

transcrição do gene ocorre pelo gene NOS-2). Nestes estudos se observa a correlação entre o aumento da expressão da HSP70 e a diminuição da ativação do NF- κ B (Feinstein *et al.*, 1996).

Esta capacidade inibitória da HSP70 intracelular sobre a inflamação representa a proteção celular diante de desafios metabólicos intensos, como por exemplo, em células submetidas a condições de estresse nitrosativo (reação entre o NO e moléculas intracelulares como a glutathiona, formando o composto chamado S-nitrosoglutathiona, deteriorando as defesas antioxidantes celulares), condição na qual ocorre a indução da expressão de grandes quantidades de HSP70 capazes de prevenir a apoptose celular pela mediada pelo tratamento com TNF- α (Kim *et al.*, 1997).

Em condições extremas ao organismo, como no caso da sepse, a HSP70 é capaz de promover a proteção contra os efeitos danosos da ativação de genes como da iNOS (NOS-2), que são ativados pelo NF- κ B através da inibição da I κ B quinase e consequentemente inibição da degradação da subunidade I κ B (Chan *et al.*, 2004).

Estes estudos sugerem que a forma principalmente a forma induzível seja capaz de ligar-se ao complexo NF- κ B /I κ B no citossol impedindo a transcrição de genes dependentes deste fator de transcrição nuclear, como os genes responsáveis pela síntese de TNF- α e iNOS, que trazem prejuízos clínicos em quadros imunológicos graves como em casos de sepse (Chen *et al.*, 2005). Complementarmente, estudos demonstram que o bloqueio da síntese de HSP70 reverte o efeito inibitório sobre ativação do NF- κ B em células em células submetidas ao choque térmico (Kim *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 2004).

Neste contexto, o fato da HSP70 possuir propriedades anti-inflamatórias, quando localizadas no ambiente intracelular, pode auxiliar no esclarecimento da potente atividade de anti-inflamatória observada pelo tratamento com prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs), que são indutoras de HSP70. (Rossi *et al.*, 2000; Homem De Bittencourt e Curi, 2001; Beere, 2004).

Resumidamente, pode-se considerar que a indução da expressão HSP70, aumentando o conteúdo intracelular desta proteína, pode representar um potencial fator citoprotetor e anti-

inflamatório, por evitar a desnaturação de outras proteínas intracelulares, por influenciar na sinalização que desencadeia a apoptose e, fundamentalmente, por inibir a excessiva ativação do NF- κ B que pode trazer prejuízos celulares.

HSP70 EXTRACELULAR (eHSP70)

Desde que HSP70 pôde ser encontrada na circulação (eHSP70), existe uma constante busca de correlacionar os níveis circulantes desta proteína aos estágios de diversas doenças (Molvarec *et al.*, 2006; Nakhjavani *et al.*, 2010; Gelain *et al.*, 2011; Nakhjavani *et al.*, 2011), uma vez que em condições fisiológicas normais esta proteína é expressa em baixos níveis. Como os fatores de risco para mortalidade em muitas doenças estão relacionados com desordens no balanço redox do organismo, podendo também estar relacionados com os níveis de eHSP70 circulante, sugere-se que os níveis desta proteína possam ser indicadores de saúde, e até mesmo de longevidade (Terry *et al.*, 2004). Em pacientes com esclerose múltipla os níveis de eHSP70 são correlacionados com fibrose pulmonar, desordens vasculares, marcadores inflamatórios e estresse oxidativo (Ogawa *et al.*, 2008). Por outro lado, a suplementação com glutamina, elevando em 3,7 vezes a eHSP70 em pacientes em estado crítico foi correlacionado com menor tempo de utilização de tratamento intensivo hospitalar (Ziegler *et al.*, 2005). Em conjunto estes estudos sugerem que a elevação de eHSP70 pode significar uma tentativa de resposta imunológica diante de alguma doença ou desordem fisiológica.

A presença de eHSP70 no meio extracelular ou na circulação sugere uma possível interação desta proteína com membranas celulares, podendo iniciar cascatas de sinalização em muitos tipos de células. Esta capacidade de sinalização extracelular é confirmada devido à grande variedade de receptores que esta proteína pode interagir (Calderwood, Mambula *et al.*, 2007; Calderwood, Theriault *et al.*, 2007). No entanto, existem várias lacunas a serem preenchidas para uma melhor compreensão da origem e função da HSP70 circulante.

Atualmente, estudos buscam um melhor entendimento sobre a eHSP70, fundamentalmente sobre qual o modo pelo qual esta proteína é sintetizada e liberada para o meio extracelular. Células de mamíferos são capazes de secretar proteínas através de vesículas formadas no aparelho de Golgi após a síntese proteica no retículo endoplasmático rugoso. Estas vesículas fundem-se com a membrana plasmática liberando a proteína por exocitose. No entanto, a inibição deste mecanismo de exportação não resulta em diminuição eHSP70. A hipótese de

liberação através de lise celular, como um sinal de necrose, pode ser uma forma de gerar grandes quantidades desta proteína no ambiente extracelular, mas, no entanto, pode ser descartada como única razão para o extravazamento desta proteína, pois se observa o aumento de eHSP70 mesmo na ausência de ruptura celular (Sun e Macrae, 2005). Outra possibilidade atualmente investigada é a liberação de eHSP70 por exossomos (pequenas vesículas), que formam corpos multivesiculares e se fundem com a membrana plasmática (Lancaster e Febbraio, 2005a). Como a HSP70 não contém em sua estrutura peptídeos típicos de membrana celular, o transporte associado a lipídios pode ser o mecanismo mediador de liberação de HSP70 para o meio extracelular, porém isso não parece ocorrer em células mononucleares. O transporte pode ocorrer ainda por ligação a outras proteínas com função de lançadeira. A formação de vesículas com compartimentos proteicos específicos pode representar um importante mecanismo, uma vez que estas organelas são transportadas para a membrana celular onde ocorre a ligação a fosfatidilserina fazendo um mecanismo de “*flipping*” (Multhoff, 2007). Aparentemente, a eHSP70 pode ser oriunda de diversos tecidos e células, com mecanismos diferentes de liberação de proteínas para o meio extracelular e diferentes indutores, o que torna complexo e ainda não entendido por completo a presença de eHSP70 na circulação (Mambula *et al.*, 2007).

Especificamente em células mononucleares, a exportação de eHSP70 parece ter origem via vesículas secretadas (exossomos). Embora o choque térmico seja capaz de aumentar a quantidade de eHSP70 observada, não está esclarecido como o choque térmico leva a exportação desta proteína. Não está claro até o presente momento se o aumento da exportação pode ocorrer por um aumento de eficiência na liberação de vesículas ou por um aumento na quantidade de eHSP70 secretada por vesícula, nem mesmo se outros desafios fisiológicos como, por exemplo, o exercício físico, é capaz de influenciar esta atividade secretora (Walsh *et al.*, 2001; Ireland *et al.*, 2007).

Dentre as isoformas de HSP70, a HSP72 aparentemente é a maior representante das eHSP70, embora outras formas possam estar presente na circulação (De Maio, 2011). Uma vez presente no ambiente extracelular, a eHSP70 pode ligar-se a receptores altamente conservados chamados receptores do tipo Toll-2 e Toll-4 (TLR-2 e TLR-4, respectivamente) na superfície de células apresentadoras de antígenos, similarmente ao próprio lipopolissacarídeo (LPS) presente

em bactérias, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , bem como induzir a produção de NO (que possui importante propriedade microbicida). Estes efeitos são desencadeados pela ligação aos receptores do tipo Toll que estimulam a ativação do NF- κ B. (Lathigra *et al.*, 1991; Ensgraber e Loos, 1992; Vabulas *et al.*, 2002).

Neste contexto, o componente da *Salmonella typhimurium* responsável pela agregação da bactéria ao muco do trato gastrointestinal, correlacionado diretamente com a severidade da infecção, é uma HSP de 66kDa (Ensgraber e Loos, 1992). Tendo em vista que o tratamento com anticorpos para esta proteína inibe a agregação desta bactéria, surge o interesse em investigar se HSP extracelular pode estar envolvida em processos fisiopatológicos. Especificamente a HSP70, pode ter participação da virulência de patógenos, uma vez que uma proteína de 71kDa, homóloga a HSP70 humana, esta presente tanto intra como extracelularmente em *Coxiella burnetii*, uma bactéria intracelular obrigatória causadora da febre Q, que se replica em ambientes ácidos como em fagolisossomos a 37°C, indicando ser a eHSP70 um importante indicador de processos infecciosos (Lathigra *et al.*, 1991; Macellaro *et al.*, 1998). Por outro lado, a infecção por *Helicobacter pylori*, induz a baixa expressão de HSP73, HSP72 e de HSF1, diminuindo as defesas intracelulares do hospedeiro, em modelos *in vivo* e *in vitro*. (Axsen *et al.*, 2009).

Resumidamente, podemos dizer que o aumento da eHSP70 pode representar um quadro pró-inflamatório, pois a concentração elevada desta proteína no ambiente extracelular pode ser um fator deflagrador de processos inflamatórios ou uma consequência de uma inflamação já estabelecida no organismo.

EXPRESSÃO DE HSP70 PELO EXERCÍCIO

O exercício, devido as suas alterações fisiológicas inerentes, induz a expressão de HSP70 em muitas células de diferentes tecidos. A quebra da homeostasia celular, através de alterações na temperatura, no pH, na concentração de íons, na utilização de oxigênio e de glicogênio, além da depleção de ATP são fatores que podem ativar o a síntese de HSP70 durante o exercício (Noble *et al.*, 2008).

O aumento da temperatura corporal e muscular durante o exercício parece uma maneira bastante óbvia de induzir a expressão de proteínas de choque térmico. No entanto, o músculo esquelético é capaz de expressar HSP70 em resposta ao exercício físico mesmo sem estímulo térmico, o que não ocorre no músculo cardíaco, sugerindo que os mecanismos de expressão de HSP são específicos de cada tecido (Skidmore *et al.*, 1995; Harris e Starnes, 2001; Morton *et al.*, 2007; Staib *et al.*, 2007).

Embora os radicais livres sejam continuamente produzidos no organismo, durante a atividade física ocorre um aumento na produção de espécies ativas de oxigênio (Fisher-Wellman e Bloomer, 2009). Sobre este aspecto, além das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, estudos com animais e humanos sugerem que a expressão de HSP70 pode ser uma proteção complementar contra o estresse oxidativo (Smolka *et al.*, 2000; Hamilton *et al.*, 2003; Simar *et al.*, 2007). Após uma sessão de exercício, o músculo esquelético (Hernando e Manso, 1997), o músculo cardíaco (Locke *et al.*, 1995) e outros órgãos, como o fígado (Kregel e Moseley, 1996; Gonzalez e Manso, 2004), apresentam quadro de estresse oxidativo concomitantemente a concentrações intracelulares aumentadas de HSP70 (Salo *et al.*, 1991). Embora o estresse oxidativo seja claramente capaz de induzir a expressão de HSP70 em resposta ao exercício, não é a única via envolvida. (Paroo e Noble, 1999).

Em resposta ao exercício físico, ocorre ainda aumento da concentração de eHSP70 na circulação (Walsh *et al.*, 2001). Como o exercício físico gera aumento na expressão de HSP70 tanto na musculatura esquelética quanto no plasma, seria lógico supor-se que a fonte de eHSP70 circulante fosse oriunda da própria musculatura esquelética ativada durante o exercício.

Músculos posturais expressam altas quantidades basais de HSP70, o que leva a crer-se na participação da mesma na prevenção de danos musculares, na estabilidade de canais iônicos (Tupling *et al.*, 2007) e no auxílio no desenvolvimento de miofibrilos de músculos esqueléticos (Kayani *et al.*, 2008). Além disso, pode ser um fator importante para que fibras musculares lentas mantenham o fenótipo após a solicitação frequente, como no treinamento físico (Kelly *et al.*, 1996; Murlasits *et al.*, 2006).

Devido às funções intracelulares descritas para as HSP70 no músculo esquelético e pelo fato de que não há evidências de que o músculo seja o principal exportador desta proteína, sugere-se que outros tecidos ou células sejam responsáveis pelo aumento de eHSP70 na circulação. Como a liberação de proteínas do músculo para o meio extracelular aparentemente ocorra apenas em situações de estresse celular muito intenso onde pode ocorrer lise celular, não haveria aumento eHSP70 circulante em exercícios de moderada intensidade. Adicionalmente, embora tenha sido demonstrado que, tanto a duração quanto a intensidade do exercício sejam fatores que influenciam a concentração eHSP70 (Fehrenbach *et al.*, 2005) e de HSP70 na musculatura (Milne e Noble, 2002), este aumento circulante precede qualquer aumento da expressão gênica ou proteica de HSP70 no músculo esquelético (Febbraio, Steensberg *et al.*, 2002).

Como já mencionado, outros tecidos produzem HSP70 diante de desafios fisiológicos, como o exercício físico. O fígado de ratos submetidos a exercício físico apresenta alta expressão intracelular de HSP70 (Gonzalez e Manso, 2004). Em um experimento realizado com humanos submetidos a um protocolo de exercício, com o intuito de verificar-se a origem da eHSP70, foi observada a diferença arteriovenosa muscular e hepática de eHSP70, indicando que a musculatura não estaria liberando esta proteína, ao contrário do observado na diferença arteriovenosa hepática, onde há um aumento gradual da expressão de eHSP70 ao longo exercício físico (Febbraio, Ott *et al.*, 2002). Outros estudos do mesmo grupo demonstram que a administração oral de glicose antes do exercício reduz esta exportação hepática de eHSP70, sem ter gerado alterações no glicogênio muscular ou alterado o conteúdo de eHSP70 circulante (Febbraio *et al.*, 2004), fato que sugere a exportação de eHSP70 por outras células durante o exercício, como verificado na diferença arteriovenosa cerebral (Lancaster *et al.*, 2004). Embora

células do sistema imunológico, como linfócitos T, possam sintetizar e exportar HSP70 (Hunter-Lavin *et al.*, 2004; Ireland *et al.*, 2007), não há na literatura estudos que demonstrem a capacidade de exportação de eHSP70 destas células em resposta ao exercício físico.

HSP70 NO AUXÍLIO AO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Imunidade é definida como resistência a doença, sendo este mecanismo de defesa dividido em imunidade inata, que medeia a proteção inicial contra as infecções, e a imunidade adaptativa, que se desenvolve mais lentamente e medeia a defesa posterior, ainda mais efetiva contra as infecções. A imunidade adaptativa pode ainda ser subdividida em imunidade humoral e imunidade celular, as quais são mediadas por diferentes tipos de células e moléculas, designados para fornecer a defesa extra e intracelular, respectivamente (Abbas *et al.*, 2003; Playfair e Chain, 2009).

Todas as células que circulam no sangue são derivadas de uma célula precursora, na medula óssea. Essas precursoras pluripotenciais são denominadas células-tronco hematopoiéticas, que ao amadurecerem dão origem a diferentes tipos de células-tronco; eritroide (origina as hemácias), mieloide (origina monócitos/macrófagos, células dendríticas, mastócitos e os granulócitos, este último subdividido em neutrófilos eosinófilos e basófilos). Os linfócitos e células *Natural Killer* (NK) tem origem na linhagem denominada linfoide (Parham, 2001).

Além de na circulação, os linfócitos são encontrados em tecidos linfoides primários (medula óssea e no timo), onde os linfócitos se diferenciam, e em tecidos linfoides secundários (baço, adenoide, tonsilas, apêndice, linfonodos, placas de Peyer), onde os linfócitos maduros estão aptos a responder a estímulos desencadeados pela invasão de patógenos no corpo. Embora ambos os linfócitos T e B originem-se de precursores da medula óssea, os linfócitos T completam a sua maturação no timo (Parham, 2001).

A imunidade celular ocorre através dos linfócitos T. Estes combatem principalmente agentes patogênicos que vivem no interior das células, como vírus, fungos e algumas bactérias específicas que vivem no meio intracelular. Além disso, eles são responsáveis pela manutenção da individualidade (rejeição a transplantes) e pela eliminação de células envelhecidas ou transformadas. Os linfócitos são as únicas células com receptores específicos para antígenos. Embora muito semelhantes na aparência, os linfócitos são extremamente heterogêneos quanto a

sua função. Estas células são distinguidas por proteínas de superfície nomeadas por agrupamento de diferenciação numérico, CD (*Cluster differentiation*) (Janeway *et al.*, 2007).

Receptores de linfócitos T reconhecem antígenos em associação a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade MHC (*Major Histocompatibility Complex*). Estas moléculas transportam fragmentos proteicos, por exemplo, de vírus invasores ou de moléculas mutadas de células cancerígenas, do espaço intracelular para a superfície. As células T reconhecem este complexo na superfície como estranho. Dentre os linfócitos T, as células T CD4+ são chamadas de auxiliares (*T helper*) que produzem diferentes citocinas que ativam a si próprias, células T existentes na redondeza e outras células como os linfócitos B, que produzem anticorpos. Os linfócitos T CD8+ são chamados de citotóxicos ou citolíticos, isso é eles matam células que contém patógenos no meio intracelular (Playfair e Chain, 2009).

Em infecções virais ocorre o uso de elementos da célula hospedeira para fins de replicação viral. Neste sentido, a complexidade da ativação do fator nuclear κB (NF- κB) vem sendo estudada. O NF- κB é um fator de transcrição eucariótico encontrado em diferentes tipos de células (incluindo linfócitos T) e está presente no citoplasma na forma inativa, normalmente como um heterodímero, composto principalmente pelas subunidades p50 e p65. Em sua forma citossólica inativa, o NF- κB está ligado a uma proteína inibitória da família de inibidores do fator κB (I κB), normalmente I $\kappa\text{B}\alpha$. Na presença de estímulos específicos, a proteína I $\kappa\text{B}\alpha$ é fosforilada pelo complexo I κB quinase (IKK), o qual contém duas subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) e uma subunidade regulatória (IKK γ). A liberação do I $\kappa\text{B}\alpha$ resulta na translocação do dímero NF- κB para o núcleo onde se liga ao DNA em sítios específicos para κB (Piva *et al.*, 2006). O HIV-1, por exemplo, apresenta múltiplos mecanismos de ativação do complexo IKK, com a finalidade de promover a expressão de suas proteínas às custas do NF- κB das células hospedeiras. O envelope contendo a glicoproteína gp120 pode sinalizar para o NF- κB através da ligação ao receptor CD4, envolvendo respostas específicas celulares tirosina kinase p53, ou outras moléculas sinalizadoras como *Ras* ou *Raf*, que atuam ativando a IKK. Proteínas virais regulatórias e acessórias como a *Tat*, *Vpr* e *Nef* também participam na regulação do NF- κB . Deste modo, tanto citocinas inflamatórias produzidas pela célula hospedeira, quanto os produtos

virais estimulam o NF- κ B na replicação viral e na indução de apoptose da célula hospedeira (Santoro *et al.*, 2003).

Em células infectadas com vírus, prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) α,β -insaturadas, que são eletrofílicas, bloqueiam a replicação de todos os vírus de RNA e DNA já testados numa sequência de eventos que depende, para seu efeito pleno, da síntese de HSP70. Esta atividade antiviral está associada com a alteração na síntese de proteínas virais específicas gerando modificações estruturais que resultam em defeitos no processo de glicosilação, inibindo a fusão na membrana da célula hospedeira e a maturação viral. Como a síntese de HSP70 precede a síntese de proteínas virais, sugere-se que a indução da expressão de HSP70 não ocorra pelo acúmulo de proteínas virais desnaturadas, como se poderia esperar na ação de chaperona após a ação antiproliferativa das prostaglandinas. Neste sentido, relata-se a presença de HSP70 também na fase de síntese de proteínas virais, além de que a supressão de HSP70 resulta em supressão do efeito antiproliferativo da prostaglandina A1 sobre a inibição da síntese de proteínas virais, demonstrando que a HSP70 é o mediador da resposta antiviral das prostaglandinas. Adicionalmente, a expressão de HSP70 é diretamente proporcional a atividade antiviral das prostaglandinas (Amici e Santoro, 1991).

A expressão de HSP70 como mediadora da ação inibitória da síntese de proteínas virais (Amici *et al.*, 1994) deve-se a capacidade de bloquear a ativação do NF- κ B, um fator de transcrição essencial para a replicação viral, bloqueando assim replicação do HIV (Santoro *et al.*, 2003). Esta ação inibitória deve-se à capacidade da HSP70 de ligar-se ao NF- κ B e das CP-PGs de também ligarem-se ao NF- κ B e às quinases envolvidas na fosforilação de I κ B α , (Santoro, 2000). O equilíbrio na ativação deste fator de transcrição, entre a célula hospedeira e o vírus, torna-se extremamente relevante na medida em que é utilizado o NF- κ B na produção de mecanismos de defesa da célula contra o invasor, enquanto este por sua vez utiliza-o como mecanismo de replicação (Amici *et al.*, 1994; Santoro *et al.*, 2003).

Como consequência de seu efeito bloqueador da ativação do NF- κ B, as HSP70 intracelulares funcionam como poderosos agentes anti-inflamatórios, uma vez que praticamente

todas as moléculas sinalizadoras e enzimas envolvidas na inflamação têm sua expressão dependente do NF- κ B.

O estresse oxidativo tem participação tanto na indução da HSP70 quanto na função imunológica. Em linfócitos, alterações moderadas nos níveis intracelulares de glutathione tem efeitos importantes como mudanças na síntese de DNA. A produção de interleucinas e a proliferação celular de linfócitos são eventos extremamente sensíveis a depleção de glutathione (Gmunder, Roth *et al.*, 1990). Por outro lado, indivíduos com níveis intermediários de glutathione possuem quantidades maiores de linfócitos T CD4+, quando comparados com indivíduos tanto com níveis baixos quanto com níveis altos deste antioxidante, o que sugere que o sistema imunológico é influenciado por um delicado equilíbrio entre antioxidantes e oxidantes (Droge e Breitkreutz, 2000).

A HSP70 tem atuações sobre o sistema imune de duas maneiras: atuando intracelularmente (como visto) e extracelularmente. A HSP70 circulante pode gerar efeitos celulares por atuar em receptores de membrana em células apresentadoras de antígenos, receptores como TLR2 e 4, CD40, CD91, CD14 CCR5, membros da família de receptores e *scavengers* (LOX-1 e SREC-1). No entanto, pouco se sabe a respeito de receptores para HSP70 em células T, ativadas ou não (Calderwood, Mambula *et al.*, 2007; Calderwood, Theriault *et al.*, 2007; Multhoff, 2007).

A formação de exossomos contendo concentrações aumentadas de HSP70 ocorre em células em situação de choque térmico. Exossomos são secretados por linfócitos T e B, macrófagos e plaquetas, sendo possível que esta via de liberação seja específica destas linhagens celulares (Lancaster e Febbraio, 2005a; Mambula *et al.*, 2007). A exportação de eHSP70 por células mononucleares ocorre rapidamente em 2 h de cultura e se mantém exportando por 24 h, enquanto que a quantidade de HSP70 intracelular diminui. Mais especificamente, sugere-se que os linfócitos sejam responsáveis pela liberação de quase 100% da exportação total eHSP70 de células mononucleares, sendo que a expressão aumentada no meio extracelular não está relacionada com dano celular, já que a morte celular registrada é de no máximo 0,1% (Hunter-Lavin *et al.*, 2004). Corroborando estes dados, um estudo com linhagem específica de linfócitos

T humanos (Jurkat) sugere que linfócitos produzem e exportam eHSP70 em maior quantidade do que monócitos e macrófagos (Ireland *et al.*, 2007).

A eHSP70 pode ativar a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e mudar seu fenótipo para características mais citotóxicas, pois ocorre a produção de mediadores da inflamação, como IL-6 e IL-8. Enquanto isso, as propriedades de linfócitos T CD8⁺ não são afetadas de maneira importante. A ligação de eHSP70 em linfócitos T CD3⁺, via receptores do tipo *toll* (TLR2) pode resultar na ativação da resposta inata e adaptativa. A HSP70 extracelular auxilia na atividade citotóxica específica a antígenos de células T CD8⁺ além de induzir a proliferação e a citotoxicidade de células NK (Figueiredo *et al.*, 2008). Adicionalmente, células apresentadoras de antígenos como os macrófagos liberam grandes quantidades de cisteína que são captadas por linfócitos, aumentando os níveis intracelulares de glutatona dos mesmo, fato que demonstra a interação entre estas células através de sinalizadores e substratos, o que pode estar ocorrendo também via HSP70 (Gmunder, Eck *et al.*, 1990). Portanto, a eHSP70 liberada na circulação pode ter ação endócrina, parácrina ou até mesmo autócrina, dependendo da origem (a ser estudada) desta proteína.

EXERCÍCIO, SISTEMA IMUNOLÓGICO E HSP70

A participação da eHSP70 na resposta imunológica vem sendo estudada paralelamente aos efeitos do exercício físico sobre o sistema imune. No entanto, a eHSP70 circulante pode representar um mecanismo imunomodulador induzido pelo exercício físico, sendo de fundamental importância a compreensão da origem desta proteína, assim como o entendimento da resposta de células imunológicas diante das concentrações circulantes encontradas no plasma em resposta ao exercício.

Em repouso, cerca de 50% das células do sistema imunológico encontram-se no sangue, a outra metade esta ligada à parede dos vasos sanguíneos. Logo após o início de um exercício físico, a maior parte destas células presas às paredes dos vasos se desprendem devido à ativação do sistema simpático, passando para a circulação. Dependendo da intensidade do exercício, o número de neutrófilos pode duplicar, quando comparado aos valores de repouso, o de linfócitos pode quadruplicar e o de células NK pode aumentar em nove vezes. As concentrações máximas de leucócitos induzidas pelo exercício no sangue periférico durante a fase de recuperação após noventa minutos de atividade atingem 10.000 células por microlitro, podendo chegar até 60.000 após uma meia-maratona. A leucocitose induzida pelo exercício é induzida pelos níveis de cortisol, e este, por sua vez, depende da intensidade e da duração do exercício. Portanto, em indivíduos treinados, onde os níveis de cortisol encontram-se mais próximos aos níveis de repouso em exercícios moderados, o estresse ao sistema imunológico é mais brando (Weineck, 2005).

Na fase de recuperação (horas após o término do exercício), ocorre uma diminuição da concentração das células NK. O mesmo é observado em linfócitos nas primeiras 4-8 horas após os termino da atividade. Esta redução pode ser atribuída a resposta hormonal, tanto do cortisol como de adrenalina, que induzem um processo conhecido como “*homing*”, ou seja, a permanência aumentada das células do sistema imune nos órgãos e linfonodos, sendo seu patrulhamento pelo organismo diminuído tornando a defesa contra infecções limitado. Este período de maior suscetibilidade é conhecido como “janela de oportunidade para infecções”, pois

principalmente infecções nas vias aéreas superiores são facilitadas, correspondendo a segunda maior causa de interrupção de treinamento de atletas de alto rendimento (Weineck, 2005).

Por outro lado, exercícios de intensidade moderada, praticados regularmente, “aperfeiçoam” os mecanismos de defesa, seja por meio de uma atividade aumentada de macrófagos, de uma estimulação dos linfócitos ou mediante o desencadeamento de uma fase aguda de reação. Em animais infectados por vírus HSV (herpes), o exercício moderado diminui a morbimortalidade, efeito contrário ao encontrado em resposta ao exercício intenso (Pedersen e Toft, 2000). Portanto, embora os níveis de células T CD4+ e de outras células imunológicas aumentem, tanto durante o exercício intenso, quanto durante o moderado, a queda nas defesas imunológicas durante a “janela aberta”, que pode durar entre 3 a 72 horas após o exercício, ocorre apenas após o exercício intenso (Pedersen e Nieman, 1998).

O exercício físico é capaz de aumentar a atividade proliferativa (Vitorino *et al.*, 2010), a produção de citocinas por linfócitos T CD4+, além de poder aumentar a eficácia de vacinas em modelos experimentais (Rogers *et al.*, 2008). Os efeitos do exercício físico sobre o sistema imunológico são observados também em outras células, como os macrófagos, onde o exercício é capaz de estimular a fagocitose (Woods *et al.*, 2000).

Estudos com animais submetidos a treinamento moderado e a seguir a cargas súbitas de exercício físico intenso é um modelo de associação de estresse crônico com o agudo ao sistema imunológico. Neste modelo é possível verificar a adaptação resultante do treinamento, como atenuação da diminuição na percentagem das subpopulações de linfócitos T, da reposta mitogênica de linfócitos B do baço e das concentrações sanguíneas de IL-2 após uma carga aguda de exercício físico intenso. Os resultados são indicativos de que a imunossupressão causada pelo exercício físico intenso parece diminuir em animais treinados com intensidade moderada. Os mecanismos subjacentes a estas respostas ainda permanecem desconhecidos (Lin *et al.*, 1995).

Pelo exposto acima, o exercício físico é um importante estímulo ao organismo devido a sua capacidade de aprimorar o sistema imunológico. Entretanto, apesar de este efeito ser dependente da intensidade, conforme proposto por Nieman em 1994 (figura 2) (Nieman, 1994), e de o exercício físico consistir num meio prático e viável de tratamento coadjuvante ou de

prevenção de muitas doenças, não existem marcadores para o ponto ótimo de carga de exercício para que esse objetivo seja atingido. Ou seja, não se tem ainda um marcador imunológico que possa aferir os ganhos trazidos por uma determinada carga (energia) de exercício, isto é, pelo produto da potência (em watts) pelo tempo. Neste sentido, os níveis de eHSP70 circulante e as quantidades de HSP70 intracelulares em linfócitos apreentam-se, ao mesmo tempo, como possíveis imunomoduladores-chave durante o exercício, e marcadores da carga ideal a ser atingida durante a atividade física.

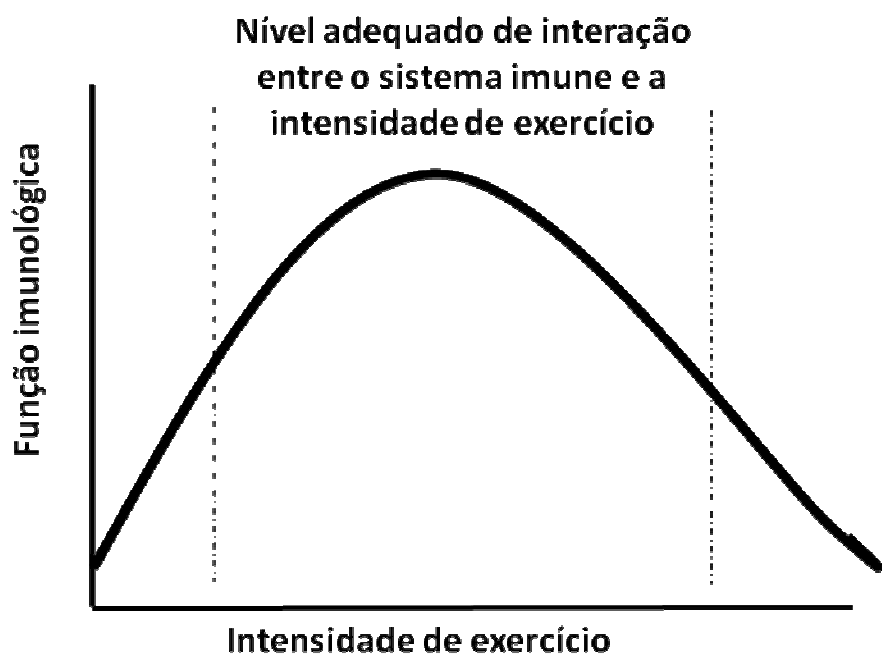


Figura 2. Relação entre o sistema imunológico e a intensidade de exercício (adaptado de Nieman, 1994)

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Verificar a utilização da HSP70 como marcador de intensidade de exercício em linfócitos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * verificar o efeito de diferentes intensidades de exercício físico no conteúdo celular de HSP70 em linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos.
- * verificar o efeito de diferentes intensidades de exercício físico no conteúdo celular de HSP70 em linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos submetidos ao choque térmico.
- * verificar o efeito de diferentes intensidades de exercício físico na exportação de HSP70 por linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos.
- * verificar o efeito de diferentes intensidades de exercício físico na exportação de HSP70 por linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos submetidos ao choque térmico.
- * verificar o efeito de diferentes intensidades de exercício físico na ativação do NF- κ B em linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos.
- * verificar o efeito de diferentes intensidades de exercício físico na ativação do NF- κ B em linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos submetidos ao choque térmico.
- * estabelecer uma relação entre a intensidade de exercício e a proliferação celular, HSP70, eHSP70 e ativação de NF- κ B em linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos submetidos ao choque térmico.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados 50 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) entre 3-4 meses de meses de idade, com peso corporal entre 250 e 350 g. Os animais foram mantidos em caixa de polipropileno (33x17x40 cm), distribuídos por experimento (5 animais por caixa), sob iluminação com ciclo de claro/escuro de 12 h, temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais receberam água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais seguiram as normas éticas brasileiras (Goldim, 1995), as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais (Hoff, 1980) e do Código Brasileiro de Experimentação Animal - 1988, em conformidade com o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* (NIH). Os protocolos de exercício físico estarão de acordo com o Livro de Modelos Animais de Exercício Físico desenvolvido pela Sociedade Americana de Fisiologia (Kregel *et al.*, 2006) e os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Utilização de Animais da UFRGS sob o protocolo de ata n° 135 da Reunião n°55 de 10 de setembro de 2009 do Comitê de Ética em Pesquisa desta Universidade.

Neste trabalho, os animais foram submetidos ao exercício físico de natação e posteriormente foram mortos. O índice de severidade do protocolo de natação é considerado como sendo moderado, tendo em vista o desconforto apenas no momento do protocolo de exercício e o fato de que os animais não se exercitaram à exaustão, quando o grau de severidade seria considerado como severo. Os animais foram mortos com uso de guilhotina, sendo observados os cuidados éticos para minimizar riscos e sofrimentos dos animais.. Como a morte é feita por decapitação para coleta do sangue total e das células e não há estágios de recuperação cirúrgica envolvidos no protocolo, pode-se considerar como um protocolo cujo final apresenta índice de severidade classificado como sem recuperação.

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado para utilização do menor número possível de animais em cada experimento. O tamanho da amostra foi calculado para detectar a menor diferença esperada entre os grupos (de acordo com a literatura 20 ± 10 ng/ mL (Febbraio et al., 2002a), para a principal variável dependente do estudo (exportação de HSP70). Foi utilizado para o cálculo um poder estatístico de 80% para um nível de significância de 0,05%. Nos experimentos com cultivo de células, o número de animais foi determinado de acordo com referência especializada (Peres & Curi, 2005). Com estes referenciais, foram designados 6 animais por grupo (em 5 grupos de acordo com a intensidade de exercício) para análise da principal variável em estudo, a exportação de HSP70.

Após a obtenção dos tecidos destinados para dosagem das variáveis dependentes, as carcaças dos animais foram armazenadas em sacos plásticos identificados com símbolo de risco biológico e levados ao freezer (- 20°C) no próprio Laboratório de Fisiologia Celular, onde há um cronograma semanal de encaminhamento deste material biológico ao biotério Central do Campus Centro da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL). No biotério Central, as carcaças permanecem até a coleta seletiva realizada pela empresa Aborgama que conduz os resíduos autoclavados ao Serviço Municipal de Limpeza Urbana.

RESUMO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram submetidos ao exercício físico em 4 intensidades diferentes ou à condição controle (repouso) por 20 minutos e imediatamente mortos para a retirada dos linfonodos mesentéricos. Os linfócitos obtidos desses linfonodos foram submetidos ao choque térmico (42°C) em banho-maria por 2 h ou à condição controle (37°C), também em banho-maria por igual período de tempo, e posteriormente cultivados por mais 6h. Imediatamente após o exercício (Tzero), após o banho-maria (Tpós banho-maria) e após 6 h de cultura (T6h) foram retiradas alíquotas para avaliação do conteúdo celular de HSP70, da expressão de mRNA de HSP70, da exportação de HSP70, da ativação do NF-κB e proliferação celular além de imunocitoquímica para HSP70 e NF-κB (Figura 2).

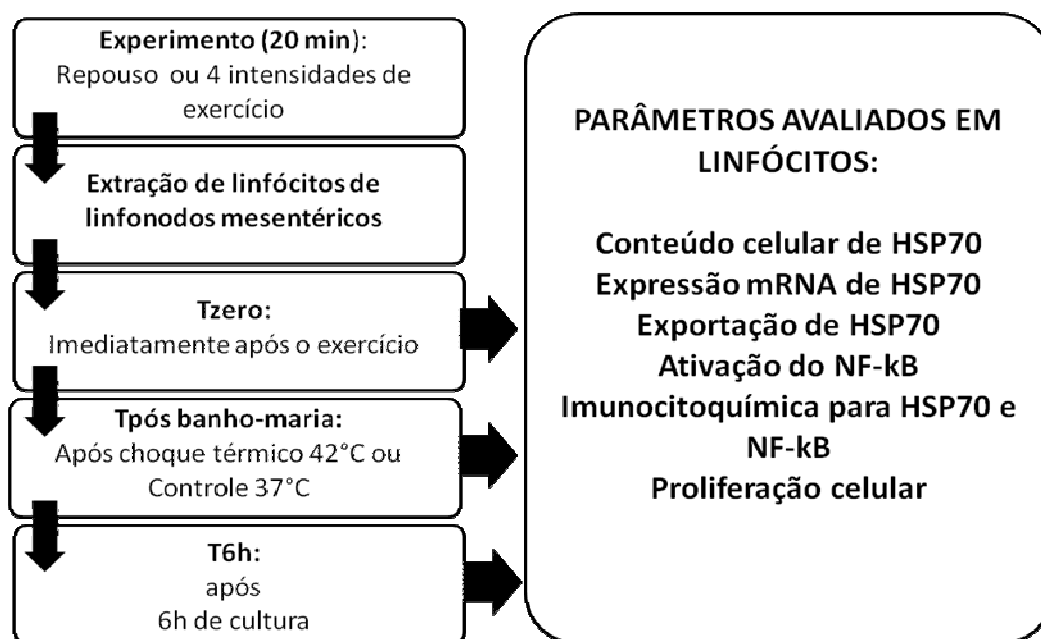


Figura 3. Fluxograma resumindo as etapas experimentais deste estudo

PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO

Os animais foram submetidos a um período de adaptação a natação por três consecutivos dias entre as 8 e 11 horas da manhã. A adaptação consiste em manter os animais nadando sem carga por 8 minutos em tanque de natação de vidro (45x45x56cm) com capacidade para que quatro animais nadem simultaneamente e individualmente (20x20x56cm para cada animal) nestes espaços preenchidos com 45cm de água a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. Este procedimento tem como objetivo iniciar o contato dos animais com a água previamente para reduzir a ocorrência de comportamentos de natação relacionados com estresse durante o experimento. Este tipo de adaptação é suficiente para minimizar o efeito do estresse nos animais além de não promover adaptações físicas relacionadas ao treinamento físico, indesejáveis neste período de adaptação. Após os três dias de adaptação, os animais foram mantidos em suas caixas sem nenhuma manipulação pelos pesquisadores por 24 horas.

Após o período de adaptação, os animais ($n=30$) foram divididos em 5 grupos: por experimento (realizado entre as 8 e as 11 horas da manhã), 4 animais realizaram exercício (20 min de natação em água a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$) em diferentes intensidades graduadas por meio de adição de sobrepeso na cauda (chumbos de pesca presos com fita adesiva) relativo ao peso corporal (2, 4, 6 e 8% do peso corporal) perfazendo então os grupos G2, G4, G6 e G8 respectivamente. No mesmo experimento, um rato foi mantido em repouso (RE) pelos mesmos 20 min em água rasa na mesma temperatura (3 a 5 cm de profundidade). Deste modo, em cada experimento havia um grupo controle, que permaneceu em repouso (RE), e 4 diferentes grupos de acordo com a intensidade de exercício proporcionada pela sobrecarga, G2, G4, G6 e G8. O tempo de duração do exercício neste estudo teve como fator determinante a capacidade dos animais realizarem exercício com 8% de carga, os quais não suportam com esta carga, mais do que 20 minutos de natação. A intensidade do exercício realizado e a condição de repouso foram confirmadas através da mensuração da concentração de lactato sanguíneo (antes e após o exercício; Fig. 5). Os animais foram mortos imediatamente após o exercício com uso de guilhotina para coleta do sangue tendo sido retirados os linfonodos mesentéricos a seguir. Foram retirados ainda, os

músculos sóleo e gastrocnêmio para dosagem de glicogênio como uma medida adicional para confirmação das intensidades do protocolo de exercício.

DOSAGEM DE LACTATO

A intensidade do exercício realizado e a condição de repouso foram confirmadas através da mensuração da concentração de lactato sanguíneo (antes e após o exercício), procedido por meio de punção caudal (~25 µL) analisado em lactímetro (Accutrend® Lactate, Roche) sendo o resultado expresso em mMol/L de sangue.

MEDIDA DA TEMPERATURA DOS ANIMAIS

Um grupo adicional de animais (n=4 por grupo, totalizando 20 animais), não foi morto após a realização do exercício para o acompanhamento da temperatura retal desde o momento antes do exercício, até 60 minutos após a execução do mesmo, sendo verificada a temperatura dos animais a cada 20 min com termômetro retal para pequenos animais. A sonda retal foi introduzida 7 mm após o ânus durante as medidas. A temperatura da água foi medida com termômetro de mercúrio padrão de laboratório sendo que não houve, em nenhum experimento, perda de temperatura da água superior a 1°C.

DOSAGEM DE GLICOGÊNIO MUSCULAR

Foram extraídos os músculos gastrocnêmios dos animais, sendo retirados cerca de 200 mg de amostras, colocadas em tubos de ensaio de parede grossa contendo KOH 30% (m/v). Os tubos foram fechados e colocados em banho fervente (100°C) até dissolver o tecido. As amostras foram ressuspensas em etanol 70% e colocadas em gelo para precipitação das moléculas de glicogênio. Em seguida, foram centrifugadas e os sobrenadantes descartados. Foi preparada uma curva padrão a partir da solução estoque de glicogênio 1 mg/ mL diluída em água milliQ. As amostras e a curva foram ressuspensas em ácido clorídrico e aquecidas em banho fervente (100°C) para que ocorresse a hidrólise das moléculas de glicogênio. Em seguida as amostras foram neutralizadas com carbonato de sódio 2 M para dosagem por kit de glicose a partir da formação de peróxido de hidrogênio e ácido glicônico por ação da glicose oxidase. A placa foi incubada por 10 min à 37°C, a leitura da absorbância ocorreu à 490 nm em leitora de microplacas de ELISA (Bio-Rad, modelo Bechnmark) e os resultados de concentração de glicogênio muscular foram expressos em mg/g de tecido fresco de tecido, devidamente corrigidos para a relação peso fresco/peso seco antes e após os protocolos de exercício.

PREPARAÇÃO CELULAR DE LINFÓCITOS DE LINFONODOS MESENTÉRICOS DE RATOS

Para a realização dos experimentos com linfócitos de linfonodo mesentérico, cada animal foi morto, mergulhado em copo de béquer contendo álcool 70% e levados para a sala de cultura para a retirada cirúrgica dos linfonodos mesentéricos. Cada animal foi posicionado em decúbito dorsal e foi realizada incisão abdominal longitudinal mediana de aproximadamente 5 cm, a partir do *processus xiphoideus* com uso de tesoura previamente autoclavada. Com uso de duas pinças foram identificados os linfonodos mesentéricos, retirados e imediatamente colocados em PBS autoclavado. Na câmara de fluxo laminar foi retirada com cuidado a gordura circundante dos linfonodos mesentéricos sob papel filtro. A seguir os linfócitos foram separados do tecido linfoide por esmagamento (em obtentor gradeado de tecidos) (Homem De Bittencourt *et al.*, 1993), filtrados em filtros Whatman (catálogo n° 2105 841, 100x150mm, previamente autoclavados juntos com funil de vidro) e centrifugados a 370g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi resuspenso em 28 mL de meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (v/v) suplementado com 2 mM de glutamina e antibiótico (estreptomicina, a 100 µg/ mL e penicilina a 100 U/ mL), gerando uma concentração aproximada de 10^7 células/mL, visto que de cada animal era obtido cerca de $2,8 \times 10^8$ linfócitos dos linfonodos mesentéricos.

Esta preparação garante uma suspensão altamente pura em linfócitos (mais de 99,5%) conforme avaliado previamente por exame de preparações histológicas coradas pela técnica de hematoxilina/eosina (Homem De Bittencourt *et al.*, 1993). A determinação da viabilidade celular foi feita pelo método de exclusão do azul de Tripan nos diferentes momentos experimentais de cultura de células.

CULTURA DE LINFÓCITOS E TRATAMENTO COM CHOQUE TÉRMICO

Linfócitos retirados de linfonodos mesentéricos ($\sim 2,8 \times 10^8$ células) foram isolados de cada animal e resuspenso em 30 mL para serem plaqueados e submetidos a dois diferentes tratamentos por 2 horas: banho-maria a 37°C (controle) ou 42°C (choque térmico). Portanto, da preparação celular de cada animal eram reservadas alíquotas para:

- a) Avaliação Tempo Zero;
 - * 2 mL para avaliação da expressão de HSP70
 - * 1 mL para avaliação da ativação do NF- κ B
 - * 100ul para avaliação do mRNA da HSP70.
 - * 400ul para avaliação da proliferação celular
 - * 1 mL para avaliação por imunocitoquímica

Para Avaliação da Resposta ao choque térmico:

- * 4 mL resuspenso em placas de 6 poços (2 mL controle e 2 mL para choque térmico, por poço) para avaliação da expressão e exportação de HSP70

- * 200 μ L retirados das placas de 6 poços imediatamente após as 2 horas de banho Maria (100 μ L do controle e 100ul da suspensão de células submetidas ao choque térmico) para avaliação do mRNA da HSP70 (Tpós banho-maria).

- * 200 μ L retirados das placas de 6 poços após as 6 horas de cultura das células que foram submetidas ao banho-maria por 2 horas (100 μ L do controle e 100 μ L da suspensão de células submetidas ao choque térmico) para avaliação do mRNA da HSP70 (T6h).

* 2 mL resuspenso em placas de 24 poços para avaliação da ativação do NF- κ B imediatamente após as 2 horas de banho Maria (1 mL do controle e 1 mL da suspensão de células submetidas ao choque térmico) (Tpós banho-maria).

* 2 mL resuspenso em placas de 24 poços para avaliação da ativação do NF- κ B após as 6 horas de cultura das células que foram submetidas ao banho Maria por 2 horas (1 mL do controle e 1 mL da suspensão de células submetidas ao choque térmico) (T6h).

* 800 μ L para avaliação da proliferação celular após as 6 horas de cultura das células que foram submetidas ao banho Maria por 2 horas (400 μ L do controle e 400ul da suspensão de células submetidas ao choque térmico) (T6h).

* 9 mL resuspenso em 9 poços em placa de 24 poços para avaliação da cinética da expressão de HSP70.

* 2 mL para avaliação imunocitoquímica imediatamente após as 2 horas de banho Maria (1 mL do controle e 1 mL da suspensão de células submetidas ao choque térmico) (Tpós banho-maria).

* 2 mL para avaliação da Imunocitoquímica (1 mL do controle e 1 mL da suspensão de células submetidas ao choque térmico) retirados após as 6 horas de cultura das células que foram submetidas ao banho Maria por 2 horas (T6h)

O restante da suspensão de células foi reservado para contagem de células e verificação da viabilidade celular.

CULTURA DE LINFÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO, EXPORTAÇÃO E DO mRNA DE HSP70 EM RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO

Da suspensão de células de cada animal foram aliqüotados 2 mL para avaliação da expressão da proteína HSP70 e 100 μ L para avaliação do mRNA de HSP70 considerado Tempo zero, pois neste ponto as células ainda não foram submetidas nem ao choque térmico nem a cultura celular em estufa. Portanto, 100 μ L ($\sim 10^6$ linfócitos) foi separado para avaliação do mRNA da HSP70 por RT-PCR em tempo real. A alíquota de 2 mL de suspensão de células foi centrifugada a 370 x g por 10 minutos e o precipitado celular foi lisado em sonicador por 30 segundos (0,5 pulsos/segundo a 75% da potência (Hielscher Instrument) em 100 μ L de solução SDS 0,1% (w/v) contendo inibidores de protease (2 μ g/ mL leupeptina e PMSF 100 μ M; concentrações finais). Os homogeneizados foram congelados em freezer -80°C , constituindo portanto as amostras para avaliação no Tzero.

Outros 4 mL foram divididos em duas diferentes placas de 6 poços; uma submetida por duas horas ao banho-maria a 37°C (controle) e outra submetida ao choque térmico (banho-maria a 42°C por duas horas). Após este tratamento (controle ou choque térmico) uma alíquota de 100 μ L (10^6 linfócitos) foi separado após banho (100 μ L choque térmico e 100 μ L controle 37°C) para avaliação do mRNA da HSP70 por RT-PCR em tempo real, enquanto que o restante foi mantido nas placas, levadas à estufa de CO_2 e mantidas em cultura por mais 6 horas. Após esta cultura celular uma alíquota de 100 μ L (10^6 linfócitos) de cada placa foi separada para avaliação do tempo 6 horas do mRNA da HSP70 por RT-PCR em tempo real enquanto que o restante foi centrifugado a 370g por 10 minutos e o precipitado celular foi lisado em sonicador por 30 segundos (0,5 pulsos/segundo a 75% da potencia (Hielscher Instrument) em 100 μ L de solução SDS 0,1% (w/v) contendo inibidores de protease (2 μ g/ mL leupeptina e PMSF 100 μ M) e congelado em freezer -80°C . O sobrenadante foi centrifugado novamente a 15.000g por 1 minuto para evitar contaminação de amostra por presença de células na alíquota de meio de cultura que foi usada para avaliação da exportação de HSP70. Foi adicionado 1 μ L de cada inibidor de protease (PMSF, Aprotinina, Leupeptina) a cada alíquota de meio de cultura antes do congelamento em freezer -80°C . Constituindo portanto as amostras para avaliação no T6h.

CULTURA DE LINFÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO

Da suspensão de células de cada animal foram aliqotados 400 μL e para avaliação da proliferação celular considerado Tempo zero, pois ainda não foi submetida nem ao choque térmico nem a cultura celular em estufa. Estes 400 μL foram divididos em 4 poços contendo 100 μL da suspensão celular (aproximadamente 10^6 por poço) em uma mesma placa de 24 poços, sendo completado o volume em cada poço até 450 μL com meio de cultura RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (v/v) suplementado com 2mM de glutamina e antibiótico (estreptomicina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e penicilina a 100 U/ mL). Dois poços receberam 25 μL da solução de Concanavalina A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ finais) em para ativação da atividade proliferativa enquanto dois poços receberam 25 μL de meio RPMI1640 contendo os demais aditivos usuais de cultura celular. As células foram mantidas em cultura por 18 horas e então foi adicionado 25 μL da solução de Timidina [$2\text{-}^{14}\text{C}$] (0,45 $\mu\text{Ci}/\text{poço}$) e cultivadas por mais 24 horas para então serem processadas para avaliação da proliferação celular. Deste modo, foi realizada a avaliação da proliferação celular no Tzero.

Outros 800 μL foram divididos em duas diferentes placas de 24 poços; uma submetida por duas horas ao banho-maria a 37°C (controle) e outra submetida ao choque térmico (banho-maria a 42°C por duas horas). Após este tratamento (controle ou choque térmico) as placas foram levadas a estufa de CO_2 e mantidas em cultura por mais 6 horas. Dois poços de cada placa receberam 25 μL da solução de Concanavalina A (ConA) em para ativação da atividade proliferativa enquanto dois poços receberam 25 μL de meio RPMI1640 contendo os demais aditivos usuais de cultura celular. As células foram mantidas em cultura por 18 horas e então foi adicionado 25 μL da solução de Timidina [$2\text{-}^{14}\text{C}$] (0,45 $\mu\text{Ci}/\text{poço}$), e cultivadas por mais 24 horas para então serem processadas para avaliação da proliferação celular. Deste modo, foi realizada a avaliação da proliferação celular no T6h. após o período de cultura celular, os linfócitos foram lavados com PBS (centrifugados 3 vezes, 15.000g x 10s), lisados com ácido tricloroacético 5% e 200 μl do sobrenadante foi aliqotado para medida de capitação celular de Timidina [$2\text{-}^{14}\text{C}$] (GE HealthCare). O precipitado foi filtrado (filtro de 0.22 μm , Millipore) em sistema *manifold* de 12

posições (Millipore). O filtro contendo o DNA precipitado foi usado para medida de Timidina [$2\text{-}^{14}\text{C}$] incorporada ao DNA. Contagem de radioatividade foi mensurada em desintegrações por minuto (dpm) nas amostras ressuspensas em líquido de cintilação (83% Tolueno, 17% Triton X-100, contendo 0,1g POPOP e 5g de PPO) e a radioatividade foi quantificada em contador específico (Liquid Scintillation Analyzer, Tri-Carb 2810TR, PerkinElmer), com auxílio do software QuantaSmart. Os resultados foram expressos em pmol de Timidina [$2\text{-}^{14}\text{C}$] incorporada ao DNA por 10^6 células, considerando a radioatividade específica usada em cada experimento.

CULTURA DE LINFÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA EXPRESSÃO DE HSP70 EM RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO

Da suspensão de células de cada animal foram aliqüotados 9 mL para avaliação da cinética da expressão de HSP70. Sendo uma alíquota de 1 mL (10^7 células) separada imediatamente após a obtenção dos linfócitos do linfonodo mesentérico, considerada Tempo Zero. Os 8 mL restantes foram separados em 2 placas de 24 poços (4 mL por placa sendo 1 mL por poço): uma placa submetida a banho-maria 37°C por duas horas (controle) e outra submetida ao choque térmico (banho-maria a 42°C por duas horas). Alíquotas de cada placa foram retiradas nos tempos imediatamente após o banho-maria (Tpós banho-maria), 2, 4 e 6 horas após o banho. Cada alíquota foi centrifugada a 370g por 10 minutos e o precipitado celular foi lisado em sonicador por 30 segundos (0,5 pulsos/segundo a 75% da potência (Hielscher Instrument) em 50 µL de solução SDS 0,1% (w/v) contendo inibidores de protease (2 µg/ mL leupeptina e PMSF 100 µM). Os homogeneizados foram congelados em freezer -80°C.

PROTOCOLO DE *WESTERN BLOT*

O conteúdo celular de HSP70 foi verificado por meio da separação por eletroforese desnaturante de quantidades idênticas de proteínas carregadas em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). De cada homogeneizado celular foi realizado a dosagem de proteína pelo método de Bradford (Bradford, 1976), homogeneizadas novamente (a uma razão mínima de 1:1) com tampão para eletroforese (50 mM Tris pH 6,8, SDS 10% (w/v), glicerol 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 10% (v/v) e 2 mg/ mL azul de bromofenol) e fervidas por 5 minutos para desnaturação completa das proteínas. Quantidades iguais de proteína (~40µg por poço) foram aplicadas no gel, para separação durante 4 h utilizando corrente elétrica constante a 15 mA por gel. Foi utilizado o sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean TetraCell (BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA, USA) preenchido com tampão contendo Tris a 25 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3. Foi usado gel de entrada (empilhamento) a 4% e gel de separação a 10% (em termos de monômeros de acrilamida). Foi usado como marcador de peso molecular 5 µL de mistura de proteínas recombinantes pré-coloridas (RPN800E, GE Health Care) por gel. A escolha por este padrão de peso molecular deve-se a presença de marcação em 76 kDa (próximo a proteína de interesse, HSP70, com ~70kDa) além da marcação em 43kDa (peso aproximado ao da proteína actina, utilizado como normalizador).

Depois da separação pela corrida em gel de poliacrilamida, a porção referente ao gel de entrada foi descartada e a porção referente ao gel de separação foi submetida a eletrotransferência. Neste procedimento foi utilizado o sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100V constantes por 2 h para promover a transferências das proteínas e padrões coloridos do gel para uma membrana de nitrocelulose (GE Health Care-Amersham). A confirmação do sucesso dos procedimentos descritos acima foi confirmada pela coloração da membrana de nitrocelulose com Vermelho Ponceau S (Red Ponceau S, sal de sódio 0,3%, Sigma, em solução de ácido tricloroacético a 3%). Após este procedimento, as membranas foram descoradas com solução TEN (Tris-EDTA-NaCl a respectivamente 50, 5 e 150 mM)-Tween 0,1% (v/v).

Os procedimentos de *imunoblotting* (*Western blots*) foram realizados em aparelho específico com uso de sistema de vácuo (SNAP i.d., MilliPore), otimizando o tempo de reação dos anticorpos sendo: Incubação instantânea a vácuo com tampão de bloqueio (leite em pó desnatado a 0,5% em TEN-Tween 0,1%); incubação por 10 minutos com anticorpo monoclonal anti HSP70 em uma (Sigma H5147, produzido em camundongo, Anti-HSP70 que reconhece tanto a forma induzível de 72-kDa quanto a forma constitutiva de 73-kDa) diluído 1:1000 em TEN-Tween 0,1%); Três lavagens instantâneas a vácuo com 15 mL TEN-Tween 0,1%); Incubação por 10 minutos com segundo anticorpo conjugado com peroxidase HRP (Sigma A9044, Anti-IgG (molécula inteira) de camundongo, a uma diluição de 1:10000 em TEN-Tween 0,1%); Três lavagens instantâneas a vácuo com 15 mL TEN-Tween 0,1%.

A imunodeteção foi realizada por quimiluminescência com uso de Luminol, ácido p-coumárico e H_2O_2 , sendo a quimiluminescência fotodocumentada (60 fotos, 1foto/10seg) em sistema automático e motorizado ImageQuant 350 (GE Health Care).

A análise do conteúdo celular de β -Actina foi usado como normalizador, utilizando os mesmos métodos e instrumentos para a incubação com anticorpo anti β -actina contendo peroxidase (Sigma A3854, 1:000).

As imagens foram quantificadas com uso do ImageQuant 350, sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias da razão HSP70/ β -actina. Após este procedimento os resultados foram expressos em relação ao grupo controle (RE) quando a comparação foi feita entre os grupos, ou em relação ao Tzero, quando a avaliação foi feita em função do tempo.

EXPRESSION DOS GENES DE HSP70 POR RT-PCR EM TEMPO REAL

Foram usados para síntese de cDNA a partir de amostras de 10^6 linfócitos os kits QuickPrep micro mRNA Purification Kit (GE Healthcare, 27-9255-01) e First-strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare, 27-9261-01). A amplificação ocorreu em PCR em tempo real (qPCR), usando protocolo recomendado pelo kit Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix, usando aquecimento inicial de 10 a 95 °C e 40 ciclos de amplificação (95 °C, 30 segundos; 60°C, 1 minuto) em termociclador MX3005P (Stratagene). Foram usadas as sequências iniciadoras (*primers*) para a forma induzível de HSP70 de rato (HSP72, Hspa1a gene NM_031971.1) (F: GCTGCGGATCATCAACG; R: AGATGAGCACGTTGCGC) e para a forma constitutiva da HSP70 de rato (HSP73, Hspa8 gene NM_024351.2) (F: GATTTGCTGCTCTTGATGTC; R: GCTTGATGAGGACAGTCATGAC) com 86 e 79bp respectivamente.

Os dados foram normalizados pelo uso do primers para β -actina (NM_031144) e GAPDH (NM_017008) com os seguintes primers: β -actina (F: GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG; R: GATGCCACAGGATTCCATACCC, 175bp product size) e GAPDH (Forward: AGTGCCAGCCTCGTCTCATAG; R: TGACTGTGCCGTTGAACTTGC, 201bp). Os resultados foram analisados no software MX 3005P (Stratagene) e expressos em relação ao grupo RE. Alternativamente, os produtos da reação do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio. Foi usado o padrão de peso molecular DNAMolecular Weight Marker (ϕ X-174-RF DNA Hae III Digest, GE Healthcare).

MEDIDA DA EXPORTAÇÃO DE HSP70

Os meios de cultura coletados (2 mL) nos experimentos no grupo T6h foram novamente centrifugados a 15.000 x *g* por 1 min para evitar contaminação de amostra por presença de células na alíquota de meio de cultura que foi usada para avaliação da exportação de HSP70 em T6H. Foi adicionado 1 µL de cada inibidor de protease (PMSF, Aprotinina, Leupeptina) a cada alíquota de meio de cultura antes do congelamento em freezer -80°C. As concentrações de HSP70 nos meios de cultura foram determinadas com o uso de Kit específico ultrasensível (HSP70 ELISA Kit, ENZO Life Sciences/Stressgen Biotechnologies, EKS-715) e o resultado foi normalizado pela quantidade de células em cada poço e pelo período de incubação, sendo expresso em ng/h/10⁸ células.

EXTRAÇÃO DE NÚCLEOS CELULARES E DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO TRANSCRICIONAL DO NF- κ B

Foram aliqüotadas em todos os grupos 1 mL com aproximadamente 10^7 células nos Tzero, T2h, T4h, T6h, T8h, T10h, T12h, T14h, T16h, T18h, T20h, T22h, T24h, T26h, T28h, T30h, T32h, T34h, T36h, T38h, T40h, T42h, T44h, T46h, T48h, T50h, T52h, T54h, T56h, T58h, T60h, T62h, T64h, T66h, T68h, T70h, T72h, T74h, T76h, T78h, T80h, T82h, T84h, T86h, T88h, T90h, T92h, T94h, T96h, T98h, T100h, após banho-maria (2 h) e T6h, e centrifugadas a 4°C, 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em tampão PBS contendo inibidores de proteases (leupeptina, PMSF, aprotinina e TLCK nas concentrações indicadas anteriormente) e fosfatases (β -glicerofosfato e ortovanadato de sódio a 1 mM cada). As células foram novamente centrifugadas a 4°C, 300 x g por 5 min. O sobrenadante foi ressuspenso em 500 μ L de tampão hipotônico e incubado no gelo por 15 minutos. Foi adicionado 100 μ L de Nonidet P-40 10% e novamente centrifugadas a 4°C, 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante contendo a fração citossólica foi descartado e o precipitado nuclear foi ressuspenso em 50 μ L de tampão de extração nuclear contendo inibidores de fosfatase e protease. As células foram agitadas em Vórtex por 15 segundos e incubadas em gelo por 15 minutos. Foi repetida esta última operação. Por fim, as amostras foram centrifugadas 14.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante, contendo a fração nuclear homogeneizada, foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, para ser armazenado em freezer -80°C.

No momento da análise da ativação do NF- κ B, as amostras foram descongeladas e a concentração de proteína nos extratos nucleares foi verificada pelo método de Bradford modificado. Para evitar interferência do próprio tampão de extração nuclear na dosagem de proteína, uma curva de albumina foi preparada em tampão de extração nuclear. Deste modo, quantidades iguais de extratos nucleares foram aplicados em microplaca de kit específico para verificação da ativação da subunidade p65 do NF- κ B (NF- κ B - human p50 e P65 Combo - Transcription Factor Assay Kit, Cayman).

Este kit é um método não radioativo, sensível e específico para detecção da atividade de ligação de fatores de transcrição de extratos nucleares ao DNA, substituindo o método mais utilizado de verificação de alteração na mobilidade eletroforética (EMSA). O kit consiste em fita dupla de DNA contendo a sequência do elemento de resposta ao NF- κ B em cada poço da placa

de 96 poços. O NF- κ B existente no extrato celular liga-se especificamente a essa região. Foi utilizado o anticorpo primário anti-p65 e um secundário contendo peroxidase para produzir a reação colorimétrica possível de ser quantificável espectrofotometricamente a 450nm.

Reagentes:

- * PBS (10X): 0,038 M NaH_2PO_4 , 0,162M Na_2HPO_4 , 1,5 M NaCl, pH 7,5
- * PBS (1x): 100 mL da solução estoque (PBS10x) em 900 mL de água destilada.
- * Inibidor de Fosfatase (50X): 0,05 M de Na_3VO_4 armazenado em freezer -80°C .
- * PBS contendo inibidores de fosfatase: 200 μl da solução de inibidores de fosfatase para cada 10 mL de PBS1X.
- * Coquetel de extração nuclear: 0,2nM Leupeptina, 1mM de PMSF, 0,008mM de Aprotinina em DMSO, armazenado em freezer -80°C .
- * Tampão hipotônico 10X: 100mM HEPES, pH7,5, 40mM NaF, 100 μM Na_2MoO_4 , 1mM de EDTA. Armazenado a 4°C .
- * Tampão hipotônico 1X: 100 μl do tampão hipotônico 10X, 20 μl de inibidores de fosfatase 50X, 10 μl de inibidores de protease 100X, 870 μl de água destilada.
- * Nonidet P-40 10%: 10% (v/v) em água destilada.
- * tampão de extração nuclear 2X: 20mM HEPES, pH7,9, 0,2mM EDTA, 3mM MgCl_2 , 840mM NaCl e 20% glicerol (v/v). armazenado a 4°C .
- * Tampão de extração nuclear: 50 μl do tampão nuclear 2X, 1 μl de inibidores de protease 100X, 2 μL de inibidores de fosfatase 50X, 10 μL DTT, 37 μl de água destilada.

IMUNOMICROSCOPIA ELETRÔNICA E DE LUZ COM HRP-DAB E IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FLUORESCÊNCIA PARA LINFÓCITOS EM SUSPENSÃO

Foram aliqüotados 1 mL ($\sim 10^7$ linfócitos) nos tempos Tzero, T_{pós} banho-maria e T6h, e fixados em paraformaldeído 4% e separados em três aliqüotas:

1) 1/3 para coloração com anticorpo (anti-hsp70-FITC, fluorescência direta) na superfície sem usar detergentes;

2) 1/3 para coloração com anticorpo primário anti-hsp70 e secundário marcado com HRP (visualização óptica e por ME); neste caso, metade desta aliqüota foi tratado com β -MCD (2,5 mM) que destrói as balsas lipídicas onde residem os exossomos; a outra metade serviu de controle positivo (sem detergente).

3) 1/3 permeabilizadas com triton para imuno-histoquímica com dupla marcação (NF- κ B e HSP70) e revelação com anticorpos secundários fluorescentes.

Protocolos:

1) Marcação somente de membrana com anticorpo fluorescente: Foi Coletado 1/3 do pellet de linfócitos e reexposto os antígenos tratando as células com 500 μ L de tampão citrato 0,1 M pH 6,0 durante 5 min em banho-maria fervente imediatamente antes da realização das marcações com anticorpos.

- As células foram centrifugadas e lavadas com PBS, precipitadas, ressuspensas com 50 μ L de tampão de bloqueio e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente.
- As células foram centrifugadas com cuidado e ressuspensas em 50 μ L de solução do anticorpo primário (FITC, Enzo, hsp72-específico, 1:100 = 1 μ L/100 μ L finais) dissolvido em tampão de bloqueio e incubado por 1 hora à temperatura ambiente.
- As células foram centrifugadas com cuidado e recuperados os anticorpos para poderem ser reutilizados.

- O precipitado de células foi lavado 1 vez com PBS e ressuspensão em 20 μ L de PBS.
- 10 μ L da preparação de células marcadas foi examinado diretamente no microscópio de fluorescência (FITC, filtro 3: Exc a 495; Emissão 518 nm)

2) Marcação somente de membrana com anticorpo primário e anticorpo secundário-HRP revelado com diaminobenzidona (DAB) na presença de peróxido de hidrogênio: foi coletado 1/3 do precipitado de linfócitos e reexpostos os antígenos tratando as células com 500 μ L de tampão citrato 0,1 M pH 6,0 durante 5 min em banho-maria fervente imediatamente antes da realização das marcações com anticorpos.

- As células foram centrifugadas e lavadas com PBS, ressuspensas em 100 μ L de PBS e separadas em duas alíquotas: uma recebeu 50 μ L de tampão de bloqueio **apenas** e outra recebeu 50 μ L de β -metilciclodextrina (β -MCD) 2,5 mM (3,3 mg β -MCD/ mL em tampão de bloqueio).
- As células foram incubadas com o detergente (β -MCD, permeabilizante de cavéolas) por 30 min a 37°C. As células tratadas com tampão de bloqueio ficaram a temperatura ambiente pelo mesmo período.
- Após a incubação com detergente (ou PBS nos controles), as células foram precipitadas e ressuspensas com 50 μ L do anticorpo primário anti-hsp72/73 (H5147 sigma, mouse anti-HSP70, 1:100, 1 μ L/100 μ L finais) em tampão de bloqueio. Incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com leve agitação (agitador orbital).
- As células foram centrifugadas com cuidado e coletar os anticorpos para serem reutilizados e lavadas 1 vez com PBS.
- As células foram incubadas com 50 μ L do segundo anticorpo marcado com peroxidase (HRP) a 1:100 (A9044, SIGMA) em tampão de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente com leve agitação em agitador orbital.

- As células foram centrifugar cuidadosamente, foi coletado o anticorpo.
- As células foram incubadas com solução de DAB 0,05% em PBS por 15 min à temperatura ambiente, centrifugadas e lavadas 3 vezes com PBS.
- As células foram resuspensas em 20 µL de PBS e um alíquota de 10 µL foi usada para visualização ao microscópio óptico.
- Tendo em vista que o precipitado de DAB oxidado pelo peróxido de hidrogênio é extremamente osmiofílico, parte das amostras foi reservada para microscopia eletrônica, após tratamento com glutaraldeído e tetróxido de ósmio, para visualização da disposição dos exossomos em cada grupo experimental.

3) Dupla marcação intracelular com anticorpos primários e anticorpos secundários fluorescentes: foi coletado 1/3 do precipitado de linfócitos e reexpostos os antígenos tratando as células com 500 µl de tampão citrato 0,1 m ph 6,0 durante 5 min em banho-maria fervente imediatamente antes da realização das marcações com anticorpos.

- as células foram centrifugadas e lavadas com PBS, ressuspensas em 50 µl de PBS-T e incubadas por 30 minutos para bloquear os sítios inespecíficos e permeabilizá-las para a entrada dos anticorpos.
- Após a permeabilização, as células foram incubadas com uma mistura (50µL dos anticorpos primários anti-hsp72/73 (H5147, Sigma) e anti-NF-κB (rabbit anti-p50 do NF-κB kit ELISA) em PBS-T por 1 hora em agitador orbital.
- Após a incubação com os primeiros-anticorpos, as células foram centrifugadas com cuidado e coletados os anticorpos para serem reutilizados. As células foram lavadas em PBS.
- As células foram ressuspensas em 50 µL da MISTURA de segundos-anticorpos (rabbit anti-mouse-FITC, F9137 da Sigma e goat anti-rabbit-biotinilado, B8895 da Sigma) em

PBS-T. As células foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com leve agitação (agitador orbital).

- As células foram centrifugadas, lavadas com PBS e coletados os anticorpos secundários para serem reaproveitados.
- As células foram incubadas com estreptavidina-Cy3 (PA43001) por 1 hora à temperatura ambiente.
- Após a incubação com estreptavidina, as células foram lavadas 3 vezes com
- As células foram contracoradas por 5 min com 50 µL DAPI (*diamidino-2-phenylindole* a 1 µg/ mL; pico de excitação a 345 nm e de emissão a 455 nm; cubo 1)
- 10 µL de amostra foi posto em uma lâmina com lamínula e visualizar no microscópio de fluorescência: fluoresceína (FITC) tem pico de excitação a 495 nm e emissão a 518 nm (cubo 3 do IX-81); Cy3 tem pico de excitação a 550 nm e de emissão a 570 nm (usado o mesmo filtro da Rhodamina, cubo 5); se for usada marcação com Cy-5, usado o cubo 6.

Estas colorações são vistas individualmente no mesmo campo visual da lâmina, onde:

Cubo 1 (DAPI, azul, permite a visualização dos núcleos);

Cubo 3 (FITC, amarelo-esverdeado, permite a visualização do conteúdo celular de HSP70);

Cubo 6 (Cy-5, vermelho, permite a visualização da localização celular da subunidade p50 do NF-κB).

Não é feita a comparação de intensidade de fluorescência entre as diferentes marcações, somente entre os grupos e tempos com a mesma marcação.

REAGENTES:

- PBS pH 7,4 para lavagens (100 mL)

- Paraformaldeído 4% em PBS: 40 mg/ mL de PBS. Preparar a partir de solução concentrada a 8% (8 g de paraformaldeído em 1 L de água MilliQ, adicionar cerca de 150 μ L de NaOH 10 M e aquecer a $\sim 60^{\circ}\text{C}$ até a solução ficar límpida). No momento do uso, diluir 1:1 com PBS.
- Glutaraldeído 2% em PBS
- OsO₄ (tetróxido de ósmio) a 2% em PBS.
- Tampão de bloqueio (BSA 1%-glicina 300 mM) em PBS: 10 mg de BSA fração V e 22,7 mg de glicina por mL de PBS pH 7,4 = em 1 mL de PBS, dissolver, sob moderada agitação, 22,7 mg de glicina e 10 mg de BSA). Esperar dissolver e guardar na geladeira até o uso (no dia!). Quantidades proporcionalmente maiores podem ser preparadas sempre no dia, a fresco!
- Tampão citrato para reexposição dos antígenos pós-fixação: citrato de sódio 100 mM pH 6,0 (25,81 mg/ mL; acertar com HCl até pH 6,0).
- Tris 10 mM pH 7,6: 1,21 mg Tris/ mL de água MilliQ. Baixar o pH até 7,6 com HCl.
- DAB 0,05%: diaminobenzidina, tetra-cloridrato (Sigma D5637, tetra-HCl, FW 360,1), PREPARAR NO MOMENTO DO USO): 0,5 mg/ mL em Tris 10 mM pH 7,6 = 1 mg em 2 mL de Tampão Tris.
- DAB 0,05%/H₂O₂ 0,01%: 1,5 mg de DAB-HCl em 3 mL de Tris 10 mM pH 7,6. Adicionar 10 μ L de solução 3% de H₂O₂ (a solução concentrada de H₂O₂ vem a 30%; diluir, no momento do uso a 1:10 com PBS ou Tris pH 7,6 = 10 μ L/100 μ L finais) para os 3 mL de solução de DAB no momento do uso e incubar imediatamente com as células.
- Tampão de Bloqueio com Triton (PBS-T): tampão de bloqueio (BSA 1% m/v, glicina 300 mM) contendo Triton X-100 (0,25% v/v): dissolver, em 1 mL de PBS, 10 mg de BSA fração V + 22,7 mg de glicina e adicionar 2,5 μ L de Triton (com ponteira para líquidos

viscosos) por mL do tampão de bloqueio (ou, diluir, primeiro, o Triton X-100 1:10, 10 µL/100 µL de PBS, e usar 25 µL desta solução por mL de tampão de bloqueio).

- As observações de imunofluorescência foram realizadas em microscópio motorizado semi-confocal Olympus IX81. As amostras reveladas com DAB foram também processadas para microscopia eletrônica de transmissão em Microscópio JEOL modelo JEM1200 ExII (40-120 kV) e aquisição digital por câmera CCD e software Gatan.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm erro-padrão da média em todas as variáveis e em todos os grupos. A comparação entre os grupos foi realizada com o teste de Análise de Variância (ANOVA) de um fator seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls para as variáveis expressão de HSP70, exportação de HSP70, mRNA de HSP70, proliferação celular, concentração de lactato sanguínea, concentração de glicogênio muscular, e viabilidade celular. Onde necessária, a comparação entre os tratamentos ao longo do tempo, como a cinética de conteúdo celular de HSP70 e ativação do NF κ B foi realizada por ANOVA de duas vias (dois fatores) de medidas repetidas, sendo as comparações entre os tratamentos em cada ponto realizada através do teste “*t*” de Student. As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS para Windows (versão 18), sendo considerada significativa a diferença estatística quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Tendo em vista que o presente trabalho tem como foco de estudo as proteínas de choque térmico torna-se relevante caracterizar no modelo experimental de exercício utilizado a temperatura dos animais. Antes do exercício físico, não foram observadas diferenças entre os grupos na temperatura retal dos animais, sendo que a média de temperatura (de todos os animais) verificada foi de $36,6 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Após serem submetidos a situação de contato com a água a 30°C por 20 min, mas sem realizar exercício, o grupo RE não apresentou modificações de temperatura corporal. No entanto, todos os animais dos grupos submetidos ao exercício na água na mesma temperatura, independente da intensidade do esforço, apresentaram queda na temperatura corporal imediatamente após os 20 min de natção, sendo que a média de temperatura apresentada após o exercício foi de $32,7 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ enquanto o grupo RE manteve a temperatura próxima aos valores observados antes da exposição a água ($36,0 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$).

Um grupo adicional de animais foi utilizado para avaliação do retorno da temperatura corporal dos animais aos níveis pré-exercício, o que ocorreu somente após 1h de recuperação (Figura 4). Importante salientar que os resultados da recuperação da temperatura corporal após o exercício são oriundos de experimentos realizados separadamente aos demais, visto que os demais dados deste presente trabalho foram obtidos de animais que foram mortos imediatamente após o exercício.

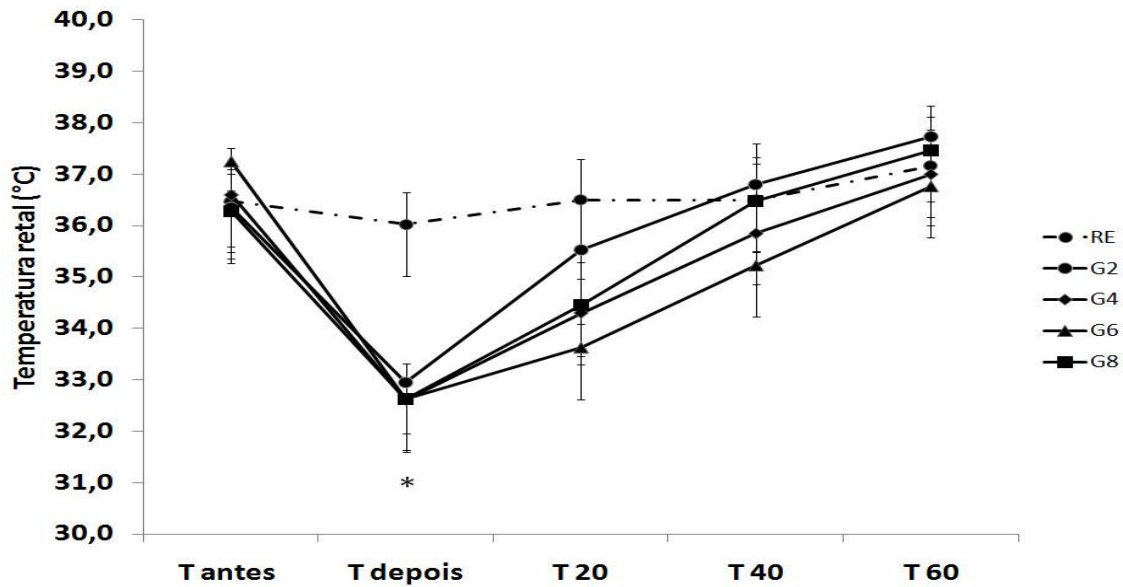


Figura 4. Temperatura retal de ratos Wistar submetidos a protocolo de natação experimental. Temperatura retal verificada antes do exercício (Tantes), após 20 minutos de natação em diferentes intensidades em água a 30°C (Tdepois) e a cada vinte minutos durante a 1 hora de recuperação do esforço (T20, T40 e T60, respectivamente). Intensidades modificadas de acordo com peso adicionado a cauda do animal constituindo os grupos G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período em água a 30°C. *p<0,05 diferença entre todos os grupos exercitados em relação ao RE.

A medida de lactato sanguíneo é uma estratégia de identificação da intensidade de exercício realizado em modelos experimentais. Neste modelo de natação, as diferentes intensidades de exercício físico foram confirmadas por esta dosagem, pois todos os grupos que realizaram exercício houve aumento da concentração de lactato sanguíneo em comparação com o grupo que permaneceu em repouso. Os grupos de G2 e G4 foram idênticos entre si quanto a esta variável, mas com valores menores que o grupo G6. No grupo G8 a concentração de lactato foi maior do que todos os demais grupos (figura 5).

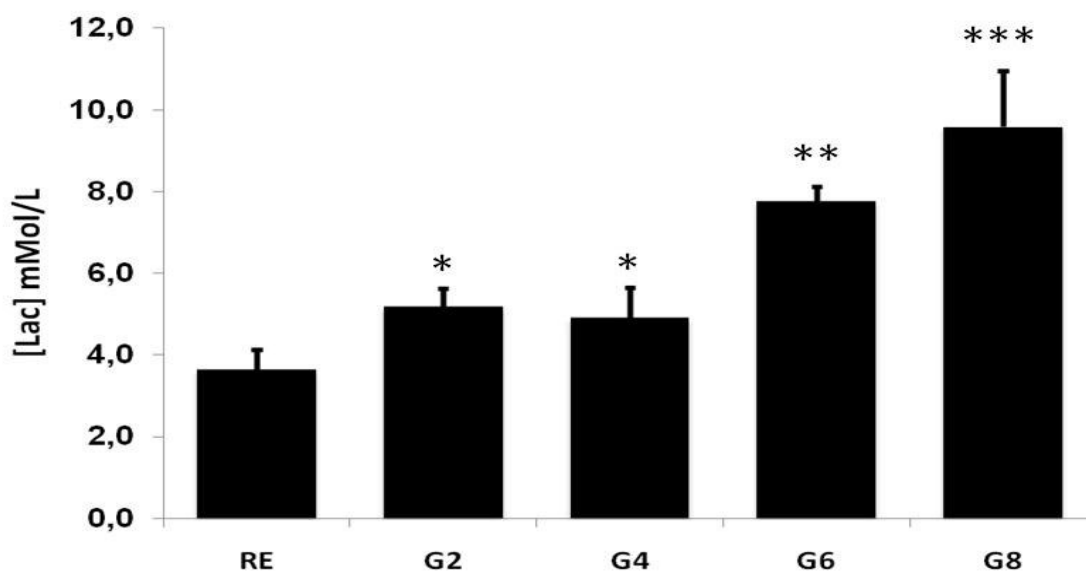


Figura 5. Concentração de lactato sanguíneo em ratos Wistar após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades.

Concentração de lactato mensurada imediatamente após 20 minutos de natação em ratos Wistar em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período. * $p < 0,05$ em relação ao RE; ** $p < 0,01$ em relação a RE, G2 e G4; *** $p < 0,05$ em relação a todos os grupos. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Após o sacrifício dos animais, foram retirados os músculos sóleo e gastrocnêmio de ambas as patas traseiras de cada animal para verificação da concentração de glicogênio muscular. Foi observado que a concentração de glicogênio no músculo gastrocnêmio foi menor quanto maior a carga imposta aos animais (figura 6). Os resultados obtidos reforçam a caracterização do presente modelo experimental como sendo um modelo de curta duração de exercício em diferentes intensidades. Em conjunto com os resultados de concentração de lactato sanguíneo, estes dados indicam que neste modelo experimental correu a constituição de grupos repouso (RE), exercício de intensidade baixa (G2) moderada (G4), moderada-alta (G6) e de alta intensidade de exercício (G8).

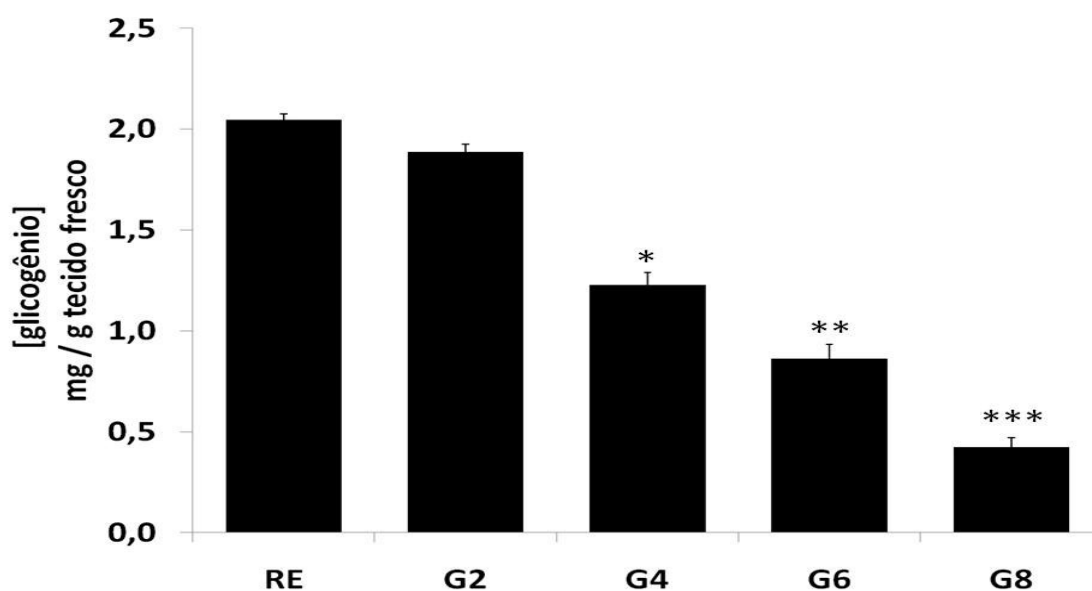


Figura 6. Concentração de glicogênio no músculo gastrocnêmio de ratos Wistar após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades.

Glicogênio mensurado imediatamente após 20 minutos de natação em ratos Wistar em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período. * $p < 0,05$ em relação ao RE; ** $p < 0,05$ em relação a RE, G2 e G4; *** $p < 0,05$ em relação a todos os grupos. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Após a realização do exercício foram retirados os linfonodos mesentéricos e os linfócitos apresentaram uma tendência de aumento na expressão de mRNA de HSP72 e HSP73 no grupo de intensidade G6(demonstrada pela linha pontilhada no gráfico) (Figura 7A). Esta mesma tendência é percebida nas células após o banho-maria (Figura 8), porém os resultados não foram diferentes estatisticamente. A amplificação dos genes de interesse foi confirmada pela fotodocumentação de gel de agarose (Figura 7B).

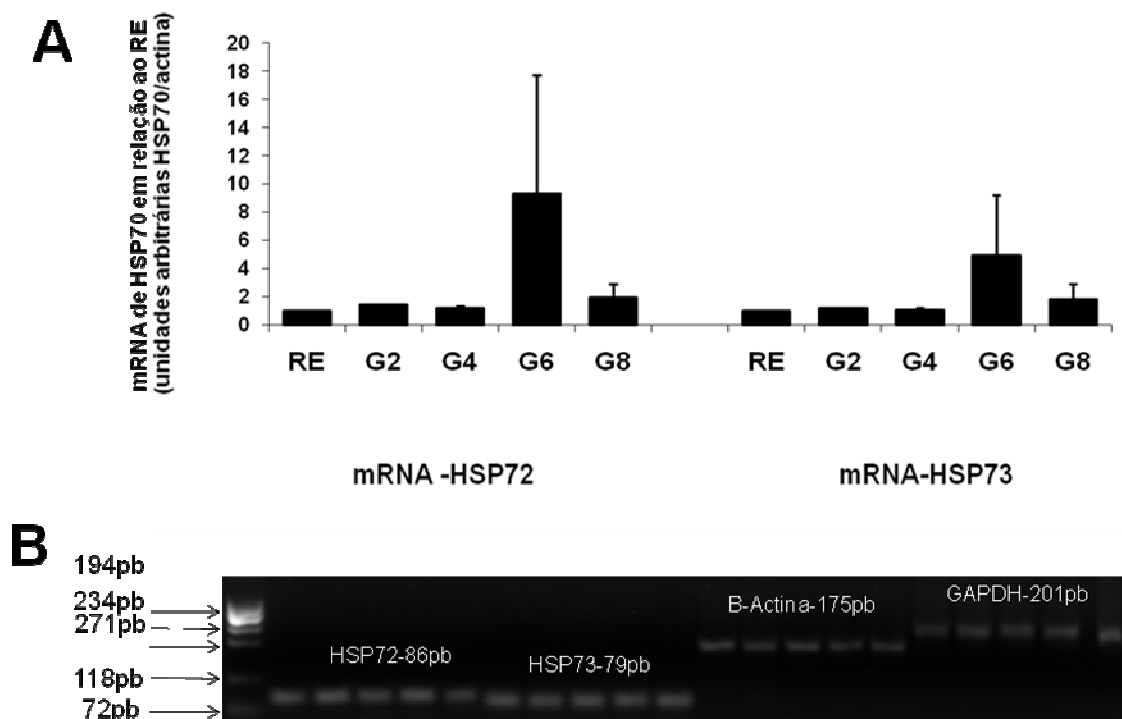


Figura 7 Expressão de mRNA de HSP72 e HSP73 após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos Wistar.

A= Expressão relativa ao grupo RE avaliado por RT-PCR em tempo real em linfócitos retirados de ratos Wistar imediatamente após 20 minutos de natação em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período. **B=** Imagem representativa de gel de agarose 2% com os produtos da amplificação por RT-PCR, ilustrando a amplificação correta dos respectivos genes de interesse. (imagem não válida para quantificação).

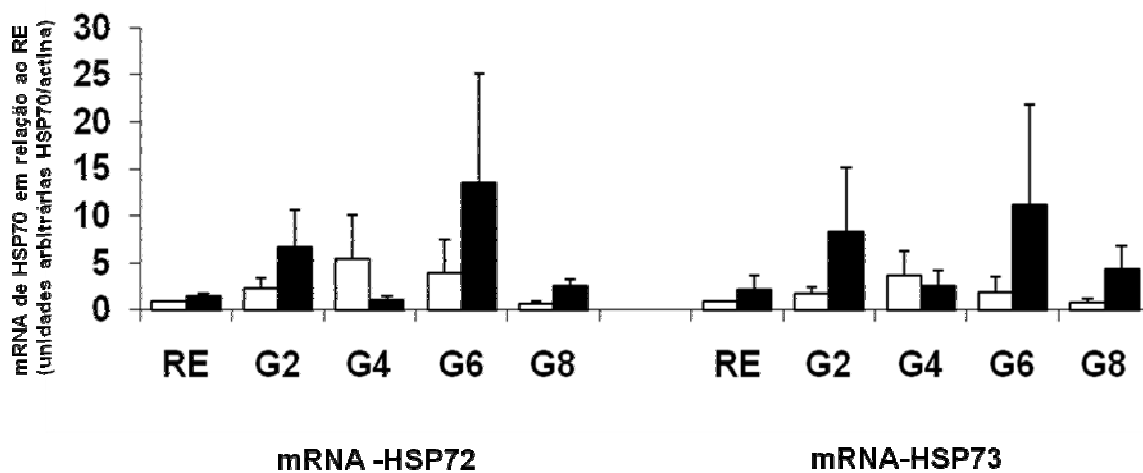


Figura 8. Expressão de mRNA de HSP72 e HSP73 após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos Wistar submetidos ao choque térmico. Expressão relativa ao grupo RE avaliado por RT-PCR em tempo real em linfócitos retirados de ratos Wistar imediatamente após 20 minutos de natação em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período.

Seis horas após o tratamento no banho-maria a 37°C houve aumento na expressão de mRNA da forma induzível (HSP72) em G8 em relação aos demais grupos. G8 também apresentou aumento na expressão de mRNA da forma constitutiva (HSP73) em relação ao RE na mesma temperatura no T6h (Figura 9). Os níveis de expressão de mRNA tanto de HSP70 tendem a ser maiores do que nas células mantidas a 37°C em praticamente todos os grupos e tempos, no entanto sem diferença significativa.

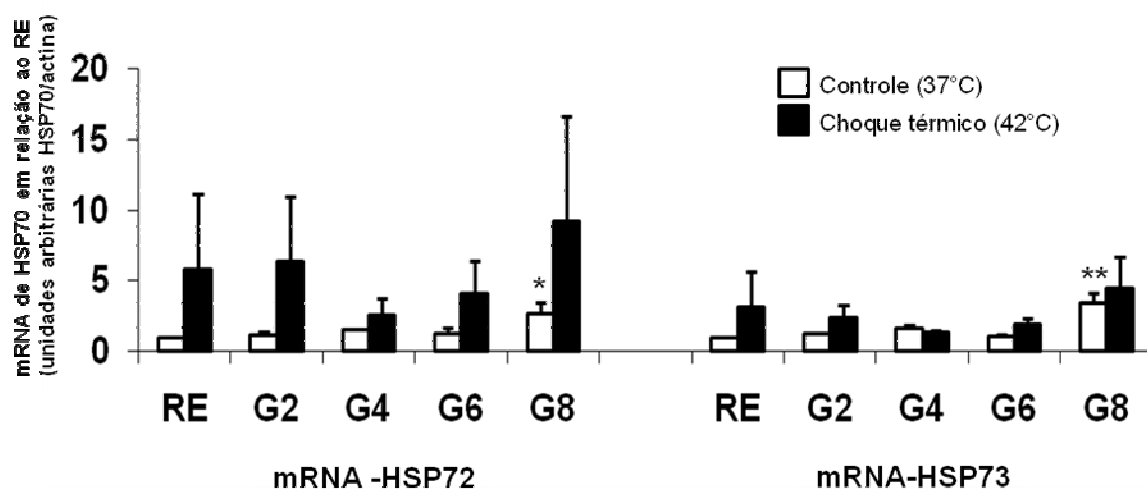


Figura 9. Expressão de mRNA de HSP72 e HSP73 após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos Wistar cultivados por 6 horas após serem submetidos ao choque térmico.

Expressão relativa ao grupo RE avaliado por RT-PCR em tempo real em linfócitos retirados de ratos Wistar imediatamente após 20 minutos de natação em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período. ..*p<0,05 em relação a todos os grupos na mesma temperatura; **p<0,05 em relação a RE na mesma temperatura. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls

Após a sessão de exercício, os linfócitos retirados de linfonodo mesentérico de cada animal foram submetidos ao tratamento de choque térmico (42°C) ou a situação controle (37°C) por duas horas em banho-maria. Após este tratamento, as células foram mantidas em culturas por 6 horas adicionais. Ao final deste período, foi observado que o grupo RE e o de G2 responderam ao choque térmico aumentando o conteúdo intracelular de HSP70, enquanto os grupos exercitados em intensidades maiores do que 2% não responderam ao choque térmico com aumento na expressão desta proteína além dos valores observados nas células mantidas a 37°C (figura 10). A tendência dos resultados em geral (representado pela linha pontilhada) é de aumento do conteúdo celular de HSP70 em G6, assim como observado nos resultados de mRNA.

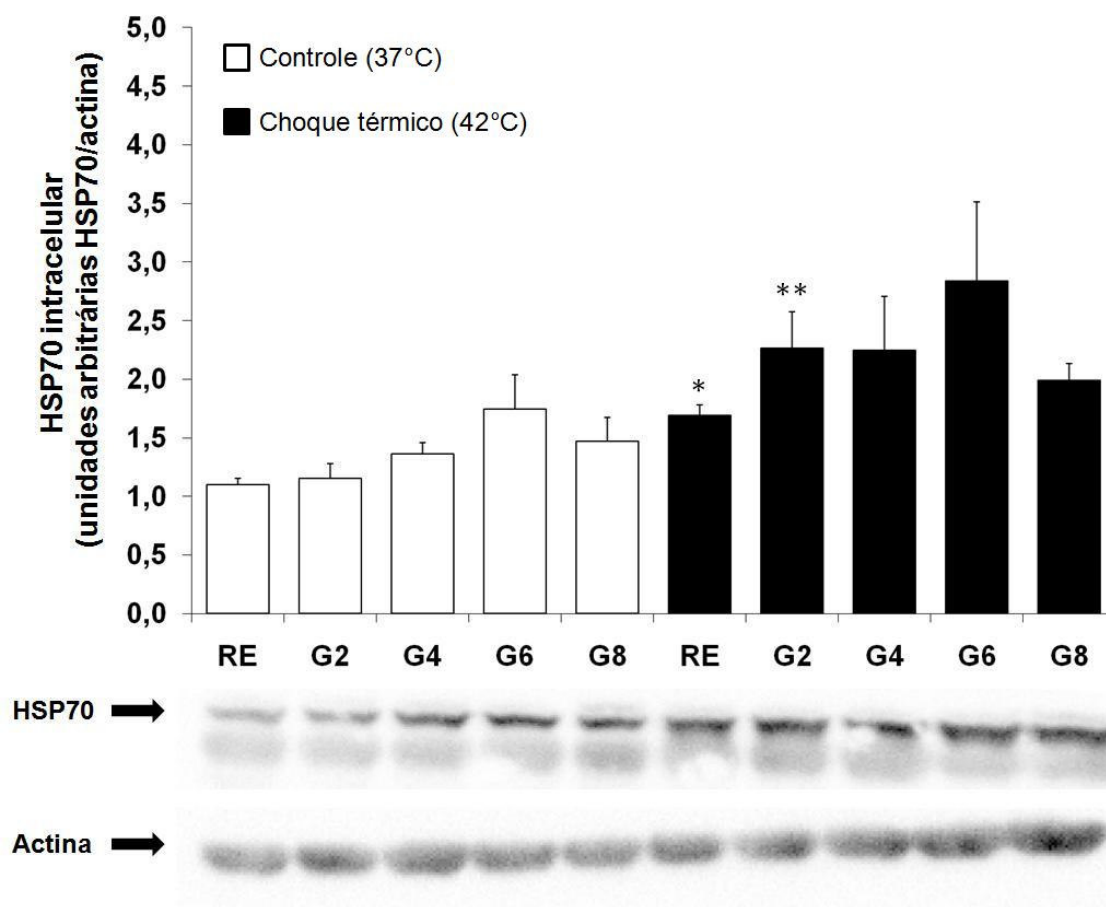


Figura 10. Conteúdo celular de HSP70 em linfócitos submetidos ao choque térmico, extraídos de ratos Wistar após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades.

Linfócitos extraídos de linfonodo mesentérico imediatamente após 20 minutos de natação em ratos Wistar em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. Após a extração, os linfócitos foram submetidos ao choque térmico (barras pretas) ou a situação controle (barras brancas) por 2h em banho maria e cultivados por 6h adicionais para avaliação do conteúdo celular de HSP70 G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período. * $p < 0,05$ em relação ao RE; ** $p < 0,05$ em relação a RE, G2 e G4; *** $p < 0,05$ em relação a todos os grupos. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

A mensuração da concentração de eHSP70 no meio de cultura demonstra que linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos exportam quantidades pequenas de HSP70 para o meio extracelular quando mantidos em a 37°C. O tratamento de choque térmico por duas em banho-maria levou ao aumento na exportação de HSP70 para o meio extracelular em todos os grupos. Adicionalmente, os linfócitos extraídos de ratos submetidos a maior intensidade de exercício (G8) exportaram maiores quantidades de HSP70 para o meio de cultura em resposta ao choque térmico (figura 11).

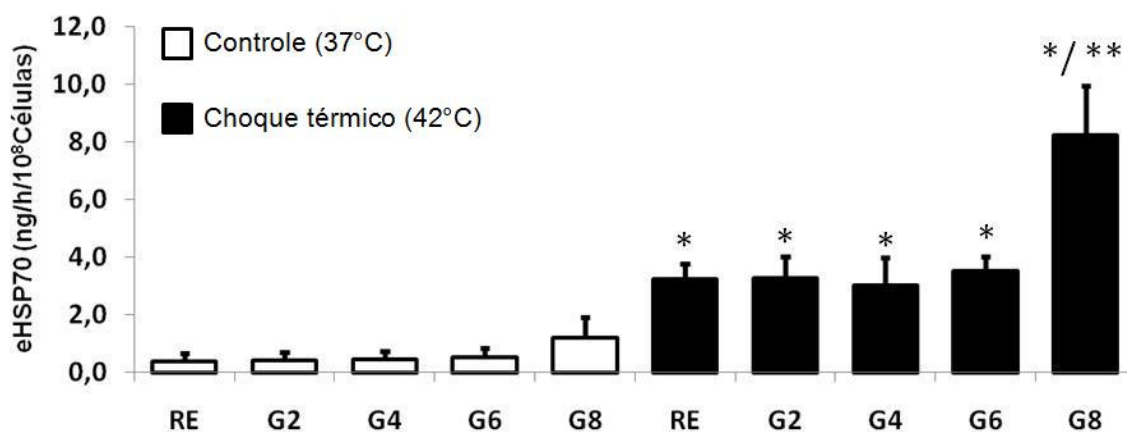


Figura 11. Exportação de HSP70 induzida por choque térmico em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício físico de natação.

Concentração de HSP70 exportada para o meio de cultura (eHSP70) por linfócitos de linfonodo mesentérico mensurada imediatamente após 6h de cultura. Células submetidas previamente a duas horas de choque térmico a 42°C (barras pretas) e mantidas a 37°C (barras brancas) retiradas de ratos Wistar imediatamente após 20 minutos de natação em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período. *p<0,001 em relação a respectivo grupo mantido a 37°C. **p<0,001 em relação a todos os grupos. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Os dados de HSP70 obtidos após 6 horas de cultura foram normalizados em relação ao RE mantidos a 37°C. O mesmo procedimento foi feito quanto os dados de exportação de HSP70. Estabelecendo o valor da relação eHSP70/HSP70 de 1:1 para RE mantido a 37°C no tempo 6h. Comparativamente esta relação aumentou no grupo G8 nas células mantidas a 37°C. Em resposta ao choque térmico esta relação aumentou em todos os grupos, sendo mais evidente também em G8 (Figura 12).

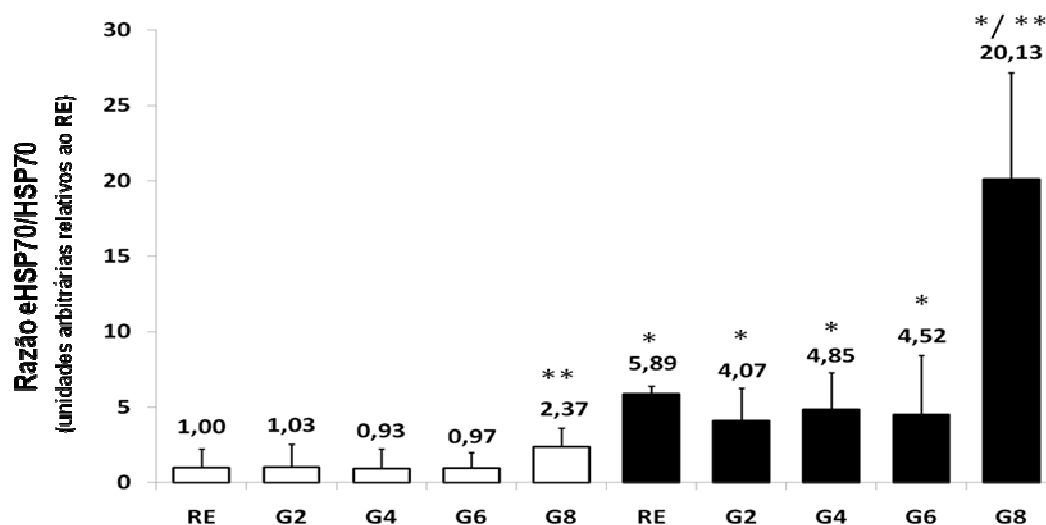


Figura 12. Relação entre a quantidade extracelular e intracelular de HSP70 induzida por choque térmico em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício físico de natação. Relação entre a concentração de HSP70 exportada para o meio de cultura (eHSP70) e intracelular de linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos que realizaram exercício. Dados do tempo 6h após o choque térmico. Células submetidas previamente a duas horas de choque térmico a 42°C (barras pretas) e mantidas a 37°C (barras brancas) retiradas de ratos Wistar imediatamente após 20 minutos de natação em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período. * $p < 0,05$ em relação a respectivo grupo mantido a 37°C. ** $p < 0,05$ em relação a todos os grupos na mesma temperatura. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Adicionalmente, a marcação com anticorpo específico para HSP70 com fluorescência, sem permeabilização celular, permitiu observar que com o aumento da intensidade de exercício ocorre diminuição da presença de HSP70 na membrana celular. Após o tratamento no banho-maria, os linfócitos mantidos a 37°C permaneceram com a marcação de HSP70 na membrana celular, enquanto o tratamento com choque térmico levou a diminuição dessa marcação. Quando mantidas por mais 6h de cultura nas mesmas condições (todas a 37°C), a marcação na membrana não é diferenciada entre as células submetidas ao choque térmico (42°C) e as controle (37°C) (Figura 13).

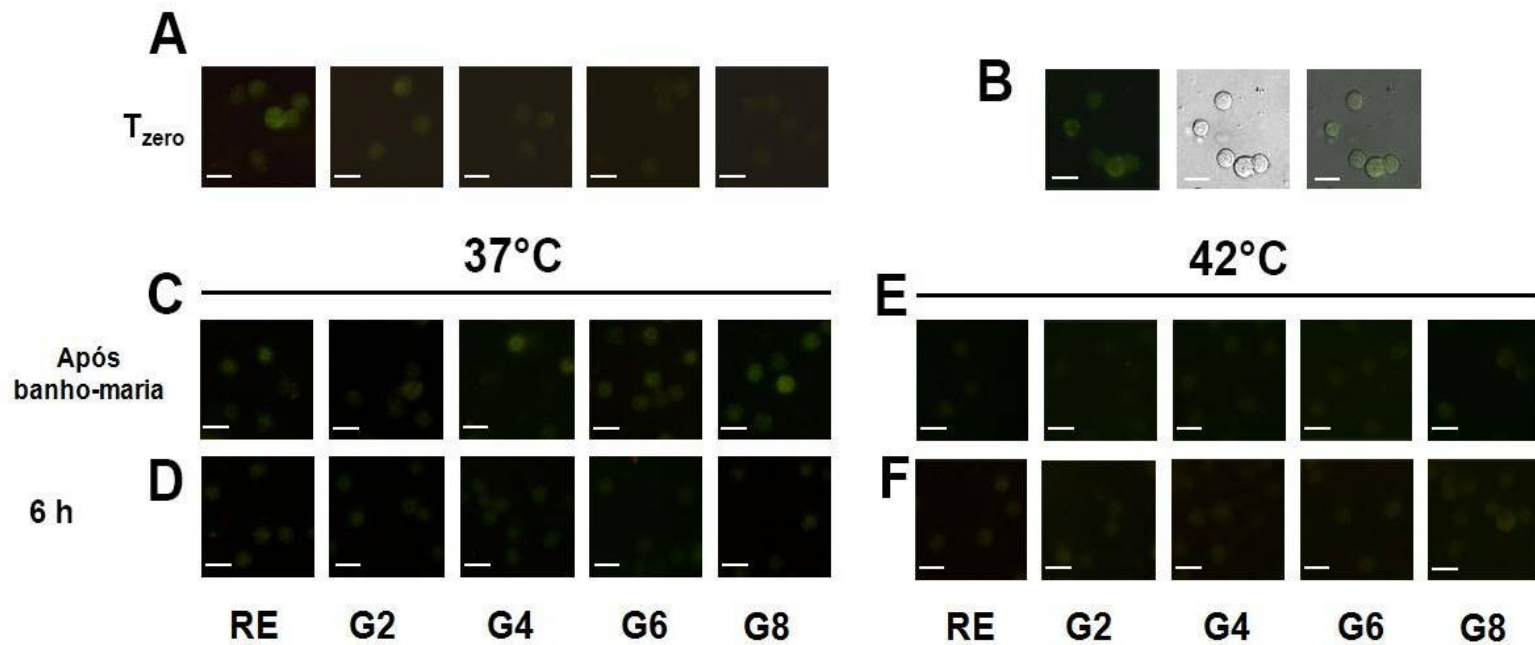


Figura 13. Marcação na membrana com anticorpo fluorescente (FITC) anti-HSP70 demonstrando a exportação de HSP70 induzida por choque térmico em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício físico de natação. A= tempo zero, imediatamente após 20 minutos de natação. B= exemplo de sobreposição de imagens para localização da proteína de interesse. C e E= após 2h de banho Maria a 37 e 42°C, respectivamente. D e F= linfócitos mantidos em cultura a 37°C por seis horas após o banho-maria a 37 e 42°C, respectivamente. Linfócitos retirados de linfonodo mesentéricos de ratos Wistar imediatamente após 20 minutos de natação em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período.

Para verificação da via de exportação de HSP70 pelos linfócitos, as células foram marcadas com anticorpo específico para HSP70 e revelados com uso de coloração com DAB. Como as células não foram permeabilizadas, a coloração demonstra a presença de HSP70 apenas na membrana celular. Como o tratamento com β -metilciclodextrina, que rompe as estruturas das cavéolas das membranas celulares, diminui esta marcação, este resultado permite a observação por meio de microscopia da presença de HSP70 nas membranas celulares de linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos de ratos (figura 14). Comparativamente, as imagens permitem a observação de que nos linfócitos do grupo RE, mantidos a 37°C em banho Maria, a coloração observada imediatamente após o sacrifício do animal, permanece na membrana celular semelhante ao Tzero. Por outro lado, no grupo G8 a marcação imediatamente após o sacrifício (Tzero) já apresenta diminuição, e a exposição ao choque térmico por duas horas leva a ausência de coloração, indicando ausência de HSP70 na membrana celular (Figura 14).

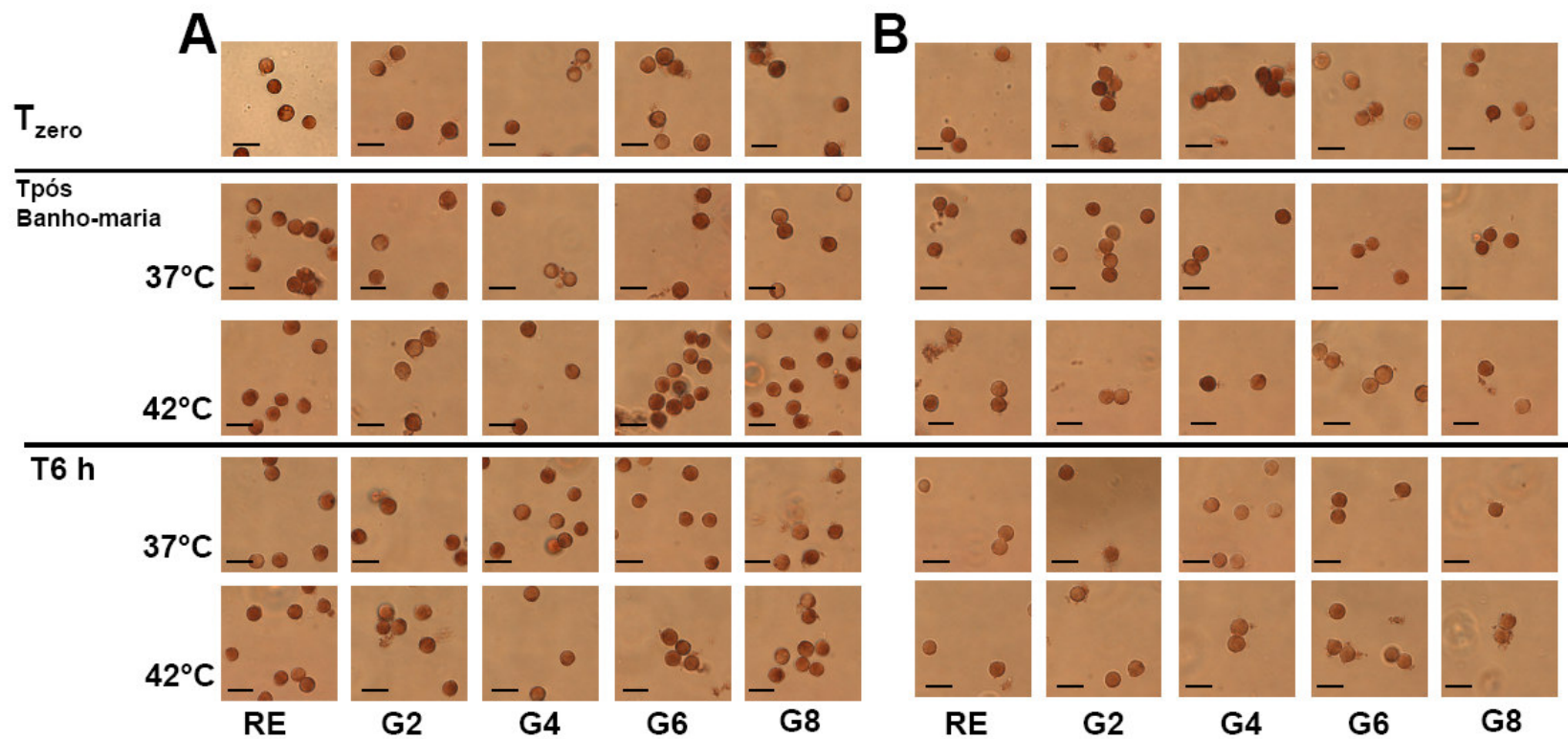


Figura 14 Marcação na membrana com anticorpo anti-HSP70 demonstrando a exportação de HSP70 via exossomos induzida por choque térmico em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício físico de natação.

A= células integras. B = Células tratadas com β-metilciclodextrina. Nos períodos, T_{zero}= imediatamente após 20 minutos de natação. Tpós banho-maria = após 2h de banho Maria a 37 e 42°C, T6h= linfócitos mantidos em cultura a 37°C por seis horas após o banho-maria a 37 e 42°C. Linfócitos retirados de linfonodo mesentéricos de ratos Wistar imediatamente após 20 minutos de natação em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período.

Para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos na análise do conteúdo intracelular de HSP70 após 6h de cultura (fig 5), alíquotas das células de cada grupo foram utilizadas para análise, imediatamente após o exercício, e a cada duas horas durante a exposição ao choque térmico e durante a cultura em estufa de CO₂. Deste modo foi possível observar que no grupo RE ocorre aumento no conteúdo intracelular de HSP70 tão logo quanto 2 h após o choque térmico, sendo que o maior conteúdo intracelular (acúmulo temporal) foi observado 4 h após o choque térmico permanecendo no T6h de cultura com valores acima das células mantidas a 37°C. (fig 15).

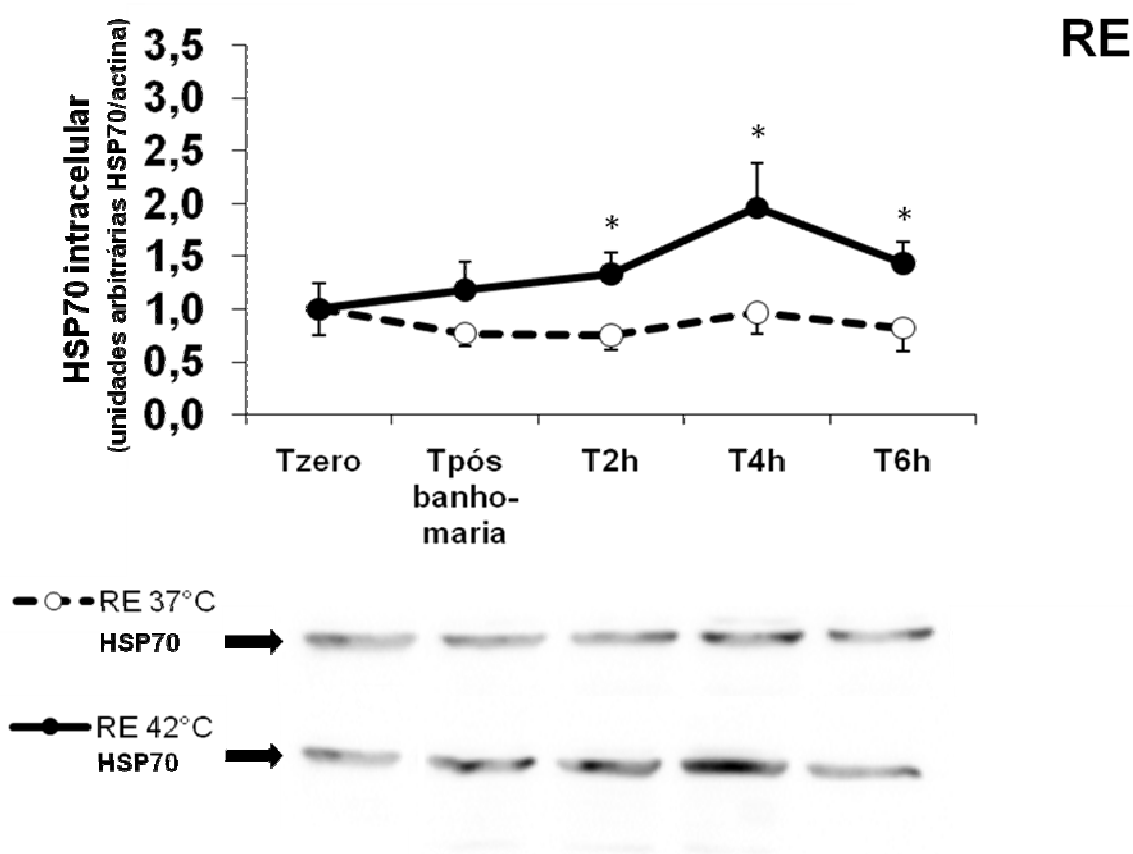


Figura 15 Conteúdo celular de HSP70 em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos que realizaram não realizaram exercício de natação com a carga de (RE). Comparação do conteúdo celular de HSP70 em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos que permaneceram em água rasa (3cm) por 20min. Tzero= imediatamente após o sacrifício; após banho-maria= após tratamento das células em banho-maria por 2 horas a 37°C (RE 37°C) ou submetidas a choque térmico em banho-maria por 2h horas a 42°C (RE 42°C; T6h= após 6 horas de cultura em estufa de CO₂ mantida a 37°C. *p<0,05 relação ao RE 37°C. ANOVA de medidas repetidas de duas vias, seguido por teste t de Student.

No grupo G2, foi possível observar um aumento no conteúdo intracelular de HSP70 somente após as 6h de cultura nas células submetidas ao choque térmico (fig16).

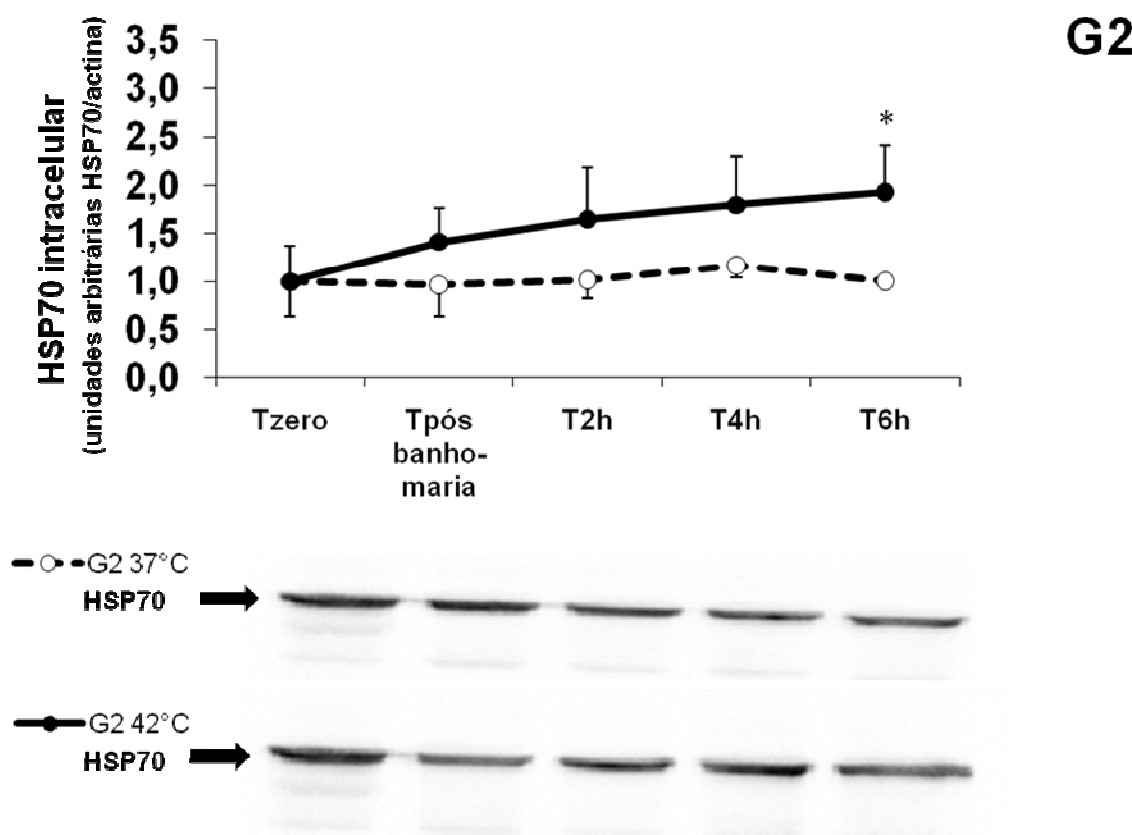


Figura 16 Conteúdo celular de HSP70 em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos que realizaram exercício de natação com a carga de 2% (G2).

Comparação do conteúdo celular de HSP70 em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos que realizaram exercício de natação com a carga de 2% (G2) por 20 minutos. Tzero= imediatamente após o sacrifício; após banho-maria= após tratamento das células em banho-maria por 2 horas a 37°C (G2 37°C) ou submetidas a choque térmico em banho-maria por 2h horas a 42°C (G2 42°C; T6h= após 6 horas de cultura em estufa de CO₂ mantida a 37°C. *p<0,05 relação ao G237°C. ANOVA de medidas repetidas de duas vias, seguido por teste T de Student.

Não foi possível observar aumento do conteúdo intracelular de HSP70 após 6h de cultura nos grupos G4 (fig17), G6 (fig18) e G8 (fig19).

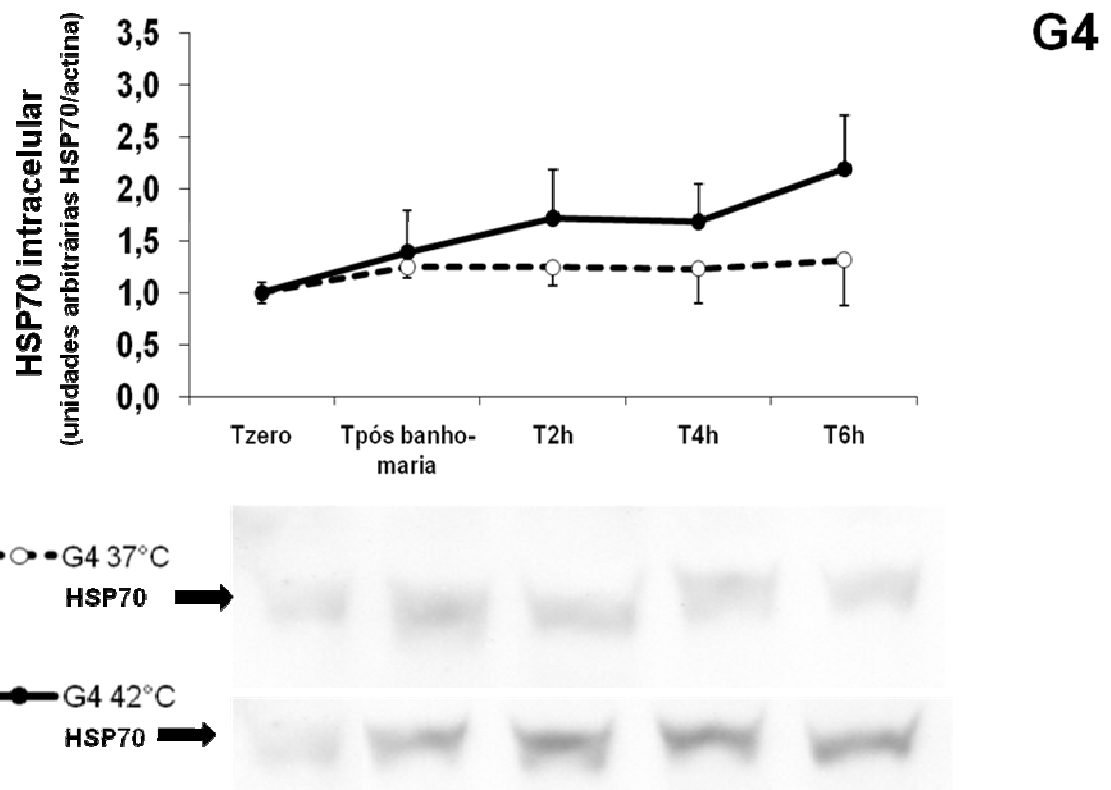


Figura 17 Conteúdo celular de HSP70 em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos que realizaram exercício de natação com a carga de 4% (G4).

Comparação do conteúdo celular de HSP70 em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos que realizaram exercício de natação com a carga de 6% (G6) por 20 minutos. Tzero= imediatamente após o sacrifício; após banho-maria= após tratamento das células em banho-maria por 2 horas a 37°C (G4 37°C) ou submetidas a choque térmico em banho-maria por 2h horas a 42°C (G4 42°C; T6h= após 6 horas de cultura em estufa de CO₂ mantida a 37°C.

No entanto, ocorre aumento do conteúdo intracelular 2h após o choque térmico em G6, sendo verificado maior conteúdo de HSP70 intracelular 4h após este tratamento (fig18).

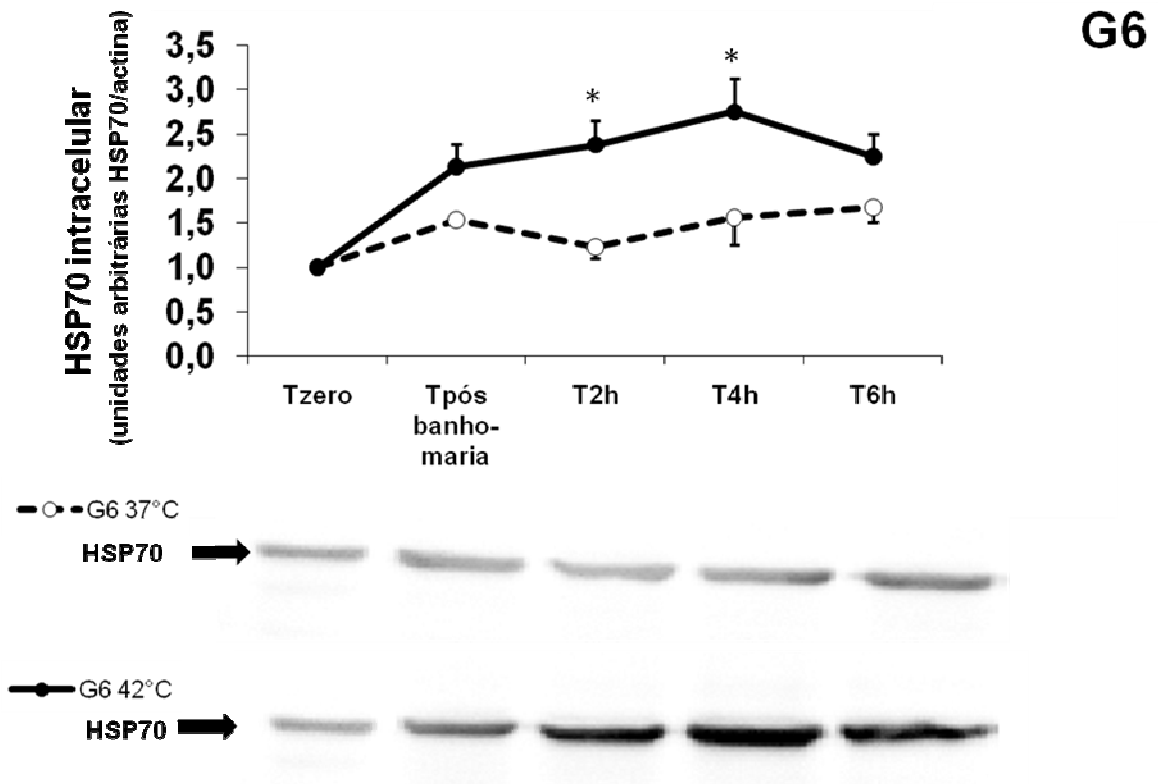


Figura 18 Conteúdo celular de HSP70 em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos que realizaram exercício de natação com a carga de 6% (G6).

Comparação do conteúdo celular de HSP70 em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos que realizaram exercício de natação com a carga de 6% (G6) por 20 minutos. Tzero= imediatamente após o sacrifício; após banho-maria= após tratamento das células em banho-maria por 2 horas a 37°C (G6 37°C) ou submetidas a choque térmico em banho-maria por 2h horas a 42°C (G6 42°C; T6h= após 6 horas de cultura em estufa de CO₂ mantida a 37°C. *p<0,05 relação ao G637°C. ANOVA de medidas repetidas de duas vias, seguido por teste T de Student.

No grupo que realizou maior intensidade de exercício (G8) não foi observado diferença no conteúdo intracelular de HSP70, ao longo da cultura celular, entre as células submetidas ao choque-térmico e as células mantidas na situação controle (Fig 19).

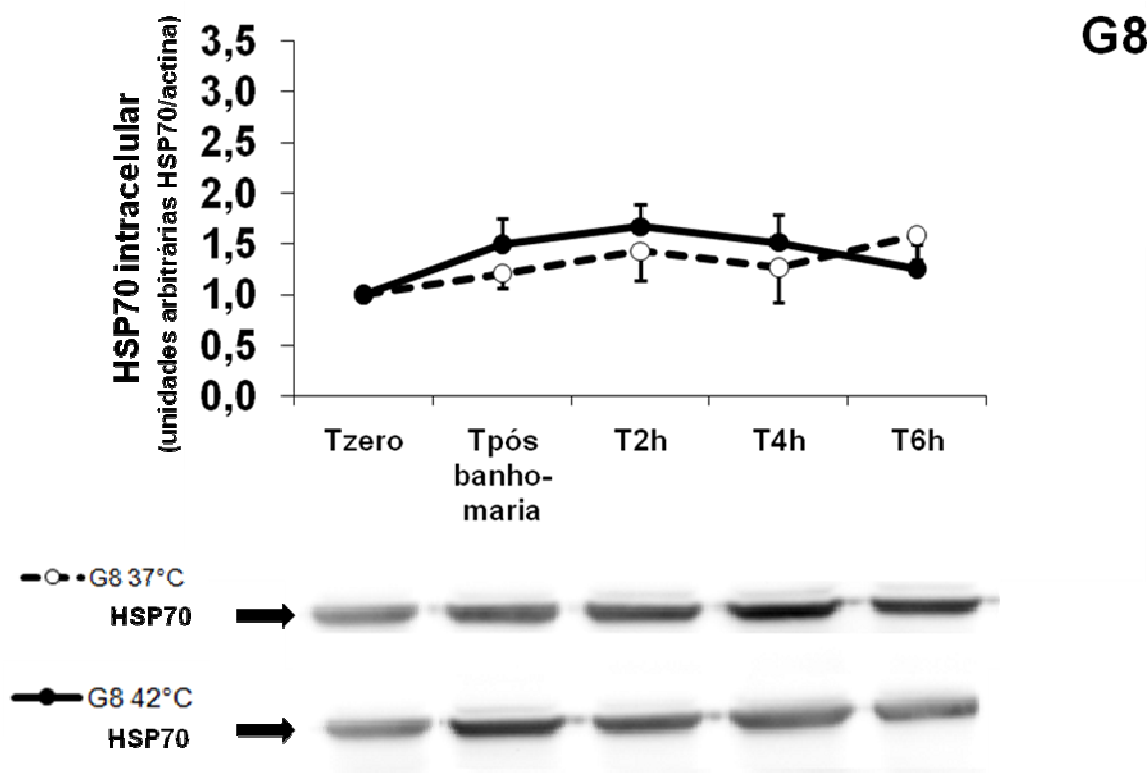


Figura 19 Conteúdo celular de HSP70 em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos que realizaram exercício de natação com a carga de 8% (G8).

Comparação do conteúdo celular de HSP70 em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos que realizaram exercício de natação com a carga de 8% (G8) por 20 minutos. Tzero= imediatamente após o sacrifício; após banho-maria= após tratamento das células em banho-maria por 2 horas a 37°C (G8 37°C) ou submetidas a choque térmico em banho-maria por 2h horas a 42°C (G8 42°C; T6h= após 6 horas de cultura em estufa de CO₂ mantida a 37°C.

Alíquotas da suspensão de linfócitos foram retiradas de cada grupo no Tzero, T6h pós banho-maria e T6h. As células foram permeabilizadas e incubadas com anticorpo específico marcando a localização celular da HSP70. Tanto o choque térmico quanto a intensidade de exercício físico foram fatores capazes de diminuir a marcação de HSP70 no citoplasma dos linfócitos e aumentar a marcação desta proteína na região do núcleo (figura 20).

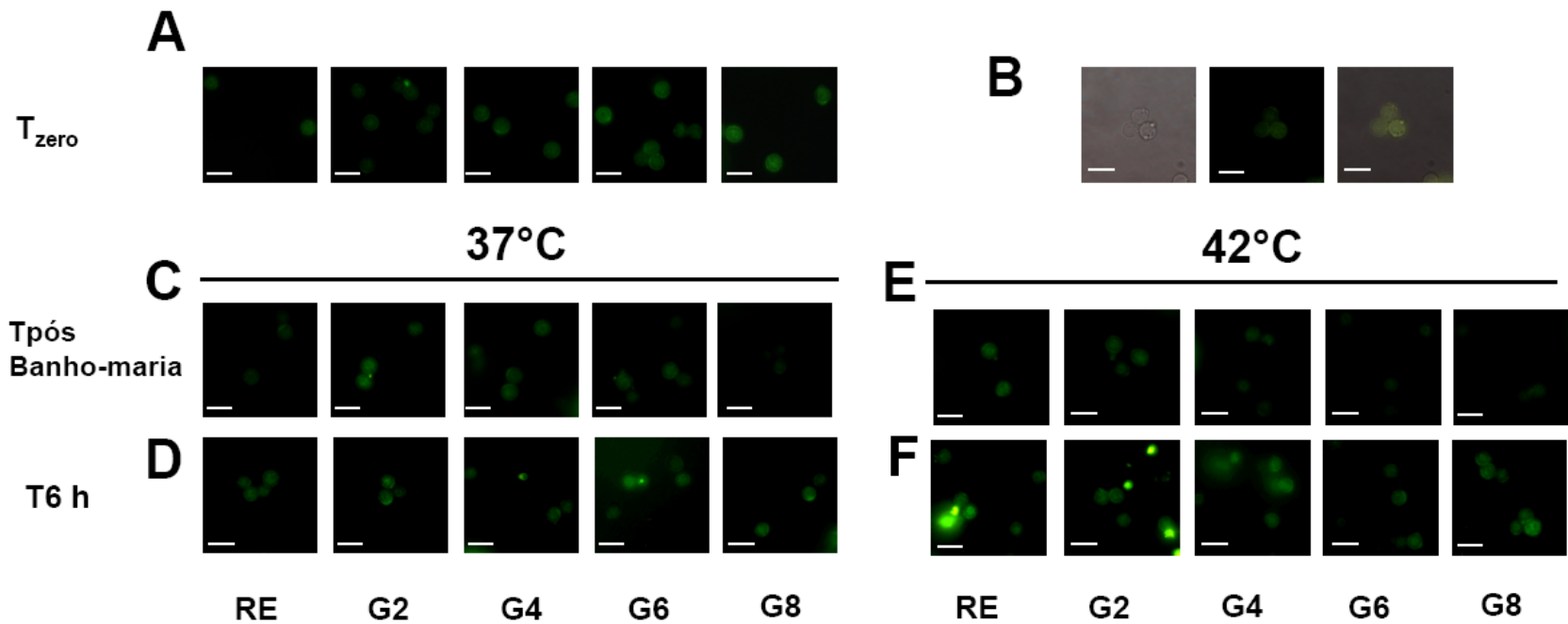


Figura 20 Marcação celular com anticorpo fluorescente (FITC) anti-HSP70 demonstrando a localização celular de HSP70 induzida por choque térmico em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício físico de natação.

A= tempo zero, imediatamente após 20 minutos de natação. B= exemplo de sobreposição de imagens para localização da proteína de interesse. C e E= após 2h de banho Maria a 37 e 42°C, respectivamente. D e F= linfócitos mantidos em cultura a 37°C por seis horas após o banho-maria a 37 e 42°C, respectivamente. Linfócitos retirados de linfonodo mesentéricos de ratos Wistar imediatamente após 20 minutos de natação em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período.

Foram extraídas frações nucleares dos linfócitos de linfonodo mesentérico dos animais imediatamente após o exercício físico e ao longo da cultura celular, especificamente nos tempos; Imediatamente após o sacrifício (Tzero), após exposição ao choque térmico ou a situação controle (Tpós banho-maria) e após as 6 horas de cultura em estufa (T6h). A extração nuclear permitiu verificar que em 6 horas após o choque térmico houve diminuição na ativação do NF-κB no grupo RE em relação ao Tzero e em relação as células mantidas a 37°C (Figura 21).

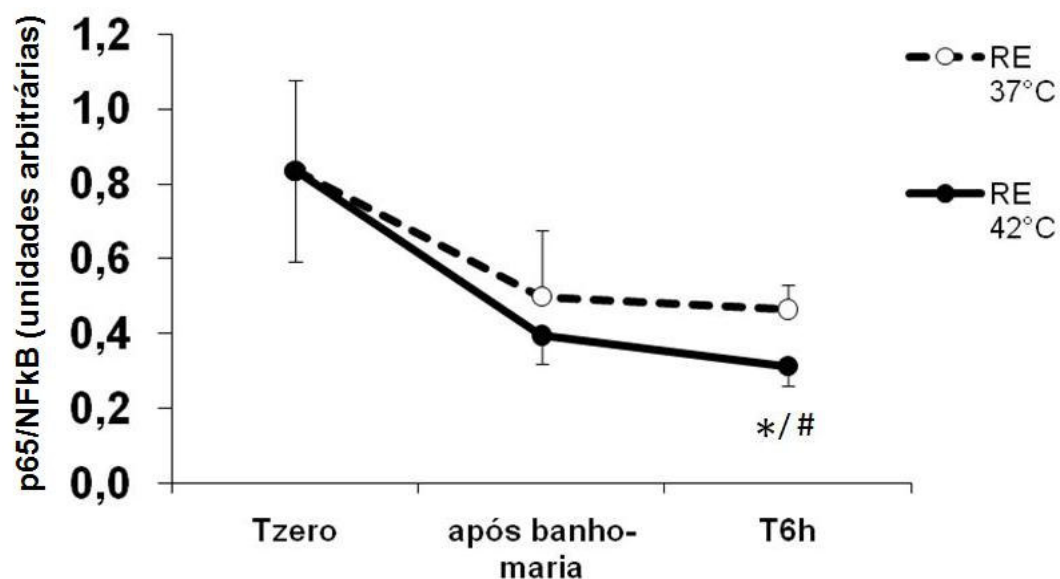


Figura 21 Ativação do NF-KB em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos mantidos em repouso.

Comparação da ativação do NF-KB em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos mantidos em Repouso (RE) por 20 minutos. Tzero= imediatamente após o sacrifício; após banho-maria= após tratamento das células em banho-maria por 2 horas a 37°C (RE37°C) ou submetidas a choque térmico em banho-maria por 2h horas a 42°C (RE 42°C; T6h= após 6 horas de cultura em estufa de CO₂ mantida a 37°C. *p<0,05 em relação ao Tzero. # p=0,033 em relação ao RE37°C. ANOVA de medidas repetidas de duas vias, seguido por teste T de Student.

Após a realização da intensidade mais baixa de exercício (G2), os linfócitos retirados dos animais deste grupo e mantidos a 37°C também apresentaram diminuição na ativação do NFkB em 6h de cultura, efeito acentuado pelo tratamento *in vitro* de choque térmico (Figura 22).

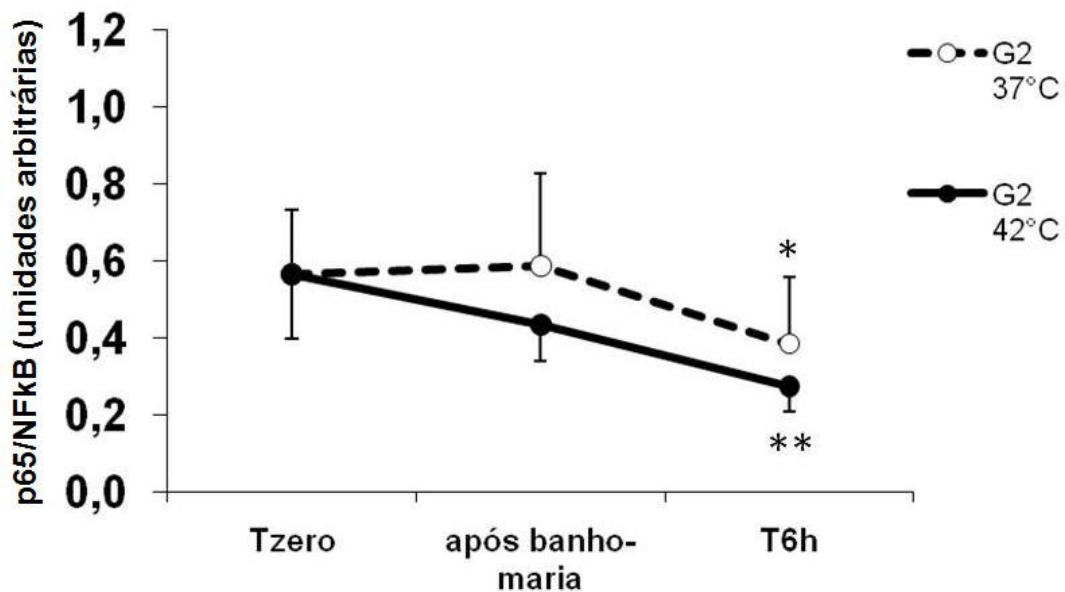


Figura 22. Ativação do NF-KB em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos submetidos ao exercício de natação com carga de 2% do peso corporal.

Comparação da ativação do NF-KB em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos ao exercício por 20 minutos com carga adicionada a cauda de 2% do peso corporal (G2). Tzero= imediatamente após o sacrifício; após banho-maria= após tratamento das células em banho-maria por 2 horas a 37°C (G2 37°C) ou submetidas a choque térmico em banho-maria por 2h horas a 42°C (G2 42°C; T6h= após 6 horas de cultura em estufa de CO₂ mantida a 37°C. *p<0,05 em relação ao Tzero. ** p<0,05 em relação ao Tzero e ao pós banho-maria a 42°C. ANOVA de medidas repetidas de duas vias, seguido por teste T de Student.

Ao aumentar a intensidade para 4% de carga, não foi possível observar diminuição na Ativação do NFkB, nem mesmo em resposta ao choque térmico (Figura 23).

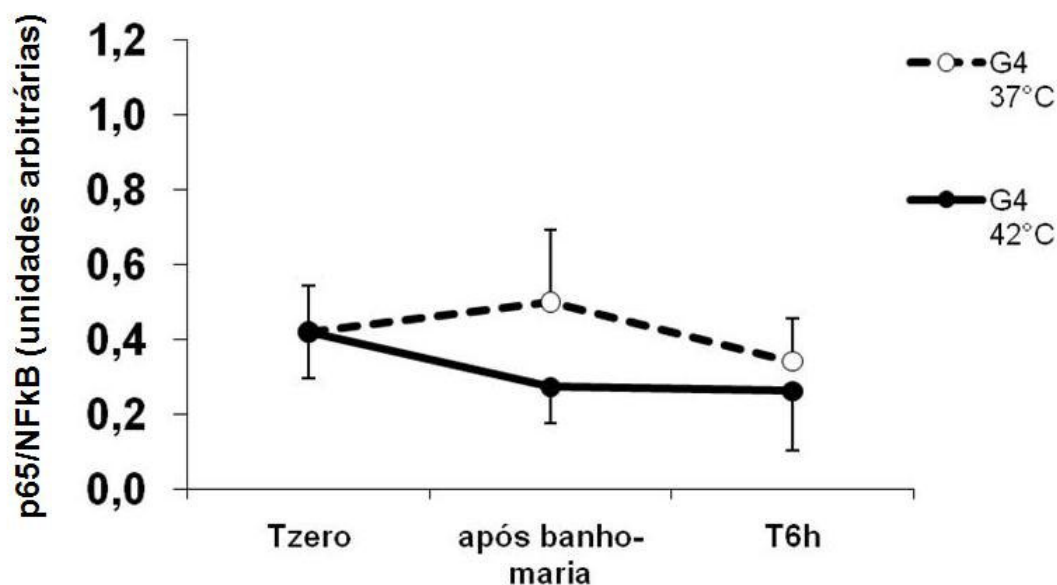


Figura 23. Ativação do NF-KB em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos submetidos ao exercício de natação com carga de 4% do peso corporal.

Comparação da ativação do NF-KB em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos ao exercício por 20 minutos com carga adicionada a cauda de 4% do peso corporal (G4). Tzero= imediatamente após o sacrifício; após banho-maria= após tratamento das células em banho-maria por 2 horas a 37°C (G437°C) ou submetidas a choque térmico em banho-maria por 2h horas a 42°C (G4 42°C; T6h= após 6 horas de cultura em estufa de CO₂ mantida a 37°C.

Em resposta a carga de exercício de 6%, os linfócitos apresentam uma queda na ativação do NFkB após as 6h de cultura a 37°C em comparação com o período imediatamente após o banho-maria. Quando submetidas ao choque térmico, essas células apresentam diminuição da ativação do NFkB também em relação ao período pós banho-maria, mas também em relação ao Tzero (Figura 24).

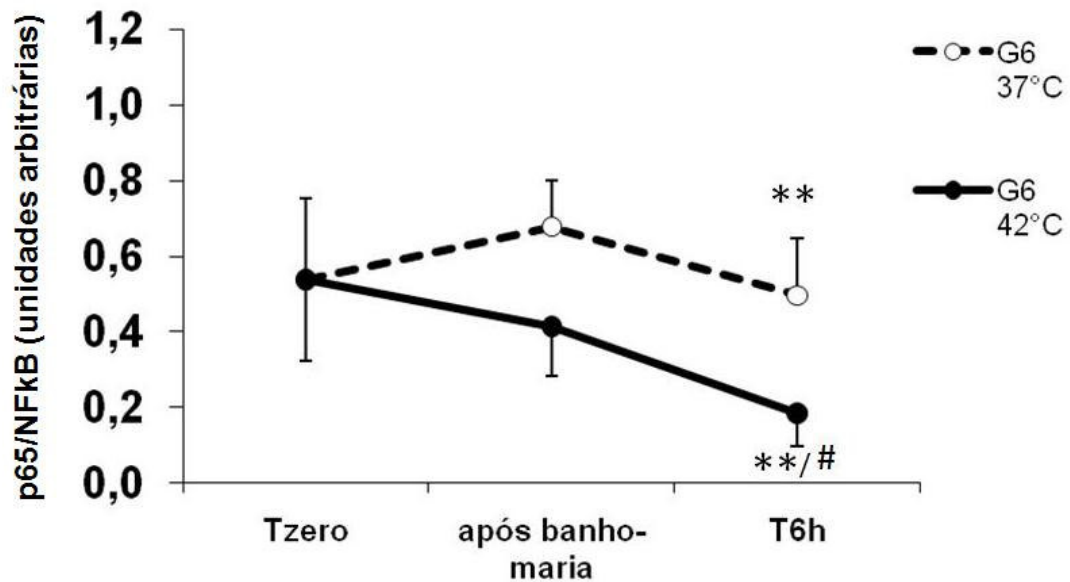


Figura 24. Ativação do NF-KB em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos submetidos ao exercício de natação com carga de 6% do peso corporal. Comparação da ativação do NF-KB em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos ao exercício por 20 minutos com carga adicionada a cauda de 6% do peso corporal (G6). Tzero= imediatamente após o sacrifício; após banho-maria= após tratamento das células em banho-maria por 2 horas a 37°C (G6 37°C) ou submetidas a choque térmico em banho-maria por 2h horas a 42°C (G6 42°C; T6h= após 6 horas de cultura em estufa de CO₂ mantida a 37°C. ** p<0,05 em relação ao pós banho-maria. # p=0,035 em relação ao G637°C no T6h. ANOVA de medidas repetidas de duas vias, seguido por teste T de Student.

A mais alta carga de exercício fez com que fossem mantidos os níveis de NFkB ao longo do tempo de cultivo celular a 37°C, sendo que o choque térmico levou a diminuição da ativação do NFkB, em relação ao Tzero (Figura 25).

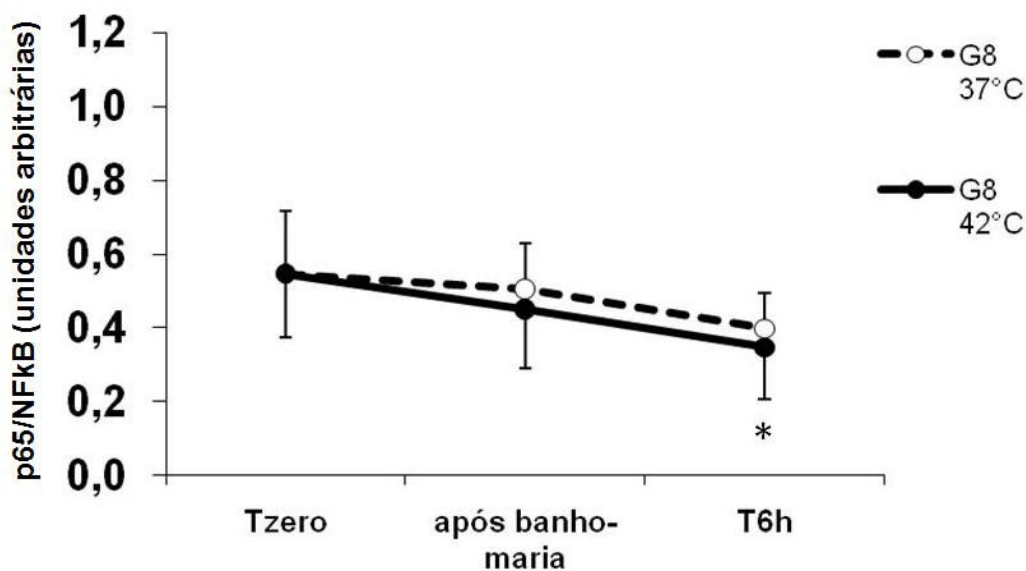


Figura 25. Ativação do NF-KB em resposta ao choque térmico em linfonodos mesentéricos de ratos submetidos ao exercício de natação com carga de 8% do peso corporal.

Comparação da ativação do NF-KB em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos ao exercício por 20 minutos com carga adicionada a cauda de 8% do peso corporal (G8). Tzero= imediatamente após o sacrifício; após banho-maria= após tratamento das células em banho-maria por 2 horas a 37°C (G8 37°C) ou submetidas a choque térmico em banho-maria por 2h horas a 42°C (G8 42°C; T6h= após 6 horas de cultura em estufa de CO₂ mantida a 37°C. * p<0,05 em relação ao Tzero. ANOVA de medidas repetidas de duas vias, seguido por teste T de Student.

Quando comparados entre os grupos, não houve diferença na ativação do NF- κ B em nenhum dos tempos, tanto na situação controle, quanto em resposta ao choque térmico. (Sendo $p=0,770$, $p=0,174$ e $p=0,108$, para as comparações nos tempos Tzero, Após banho-maria e T6h respectivamente).

Alíquotas da suspensão de linfócitos foram retiradas de cada grupo no Tzero, Após banho-maria e T6h. As células foram permeabilizadas e incubadas com anticorpo específico marcando a localização celular da subunidade p50 do NF- κ B. Tanto o choque térmico quanto a intensidade de exercício físico foram fatores capazes de aumentar a marcação de NF- κ B no citoplasma dos linfócitos e diminuir a marcação de NF- κ B na região do núcleo (Figura 26).

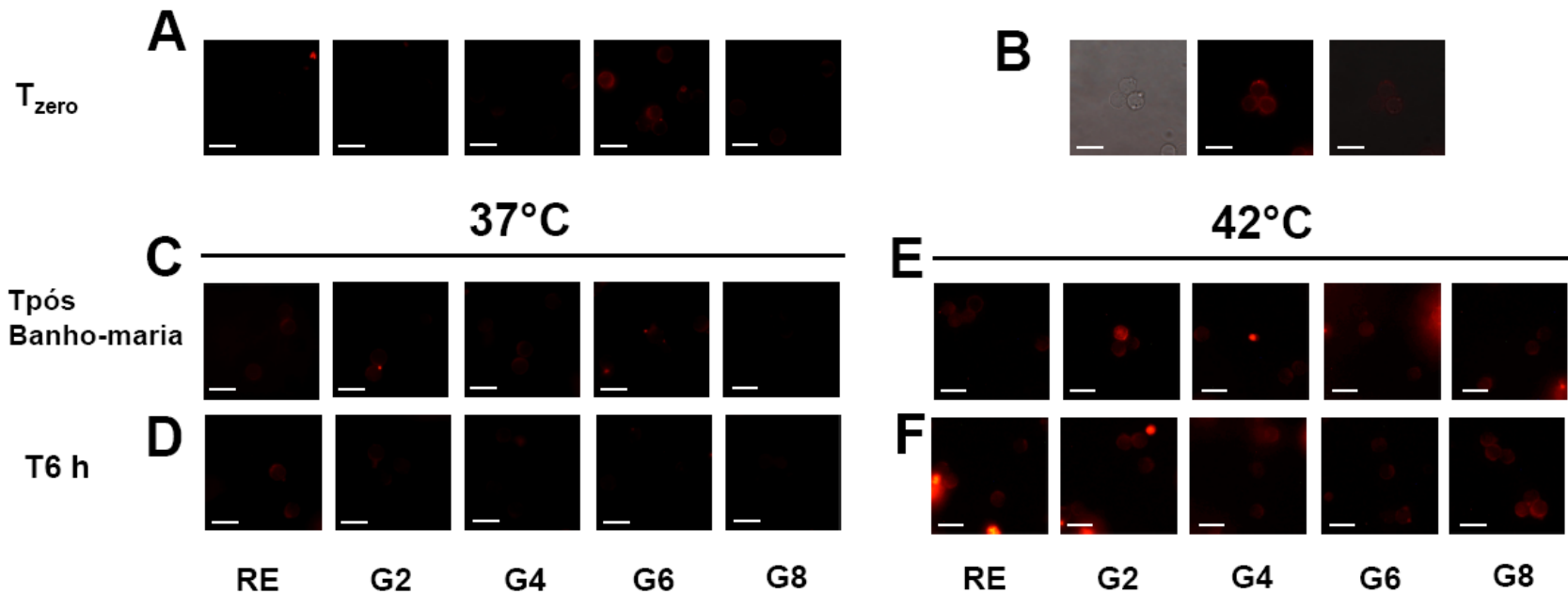


Figura 26 Marcação celular com anticorpo fluorescente anti- subunidade p50 do NF- κ B, demonstrando a localização celular de NF- κ B induzida por choque térmico em linfócitos de linfonodo mesentérico de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício físico de natação. A= tempo zero, imediatamente após 20 minutos de natação. B= exemplo de sobreposição de imagens para localização da proteína de interesse. C e E= após 2h de banho Maria a 37 e 42°C, respectivamente. D e F= linfócitos mantidos em cultura a 37°C por seis horas após o banho-maria a 37 e 42°C, respectivamente. Linfócitos retirados de linfonodo mesentéricos de ratos Wistar imediatamente após 20 minutos de natação em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período.

As imagens obtidas na microscopia com fluorescência para HSP70 e NF- κ B no Tzero foram sobrepostas (50/50%) e a nova imagem gerada (abaixo) permite visualizar com detalhe o aumento de HSP70 no núcleo das células extraídas de G6 e G8, bem como a o efeito desta intensidades em manter o NF- κ B no citoplasma (Figura 27).

Tzero

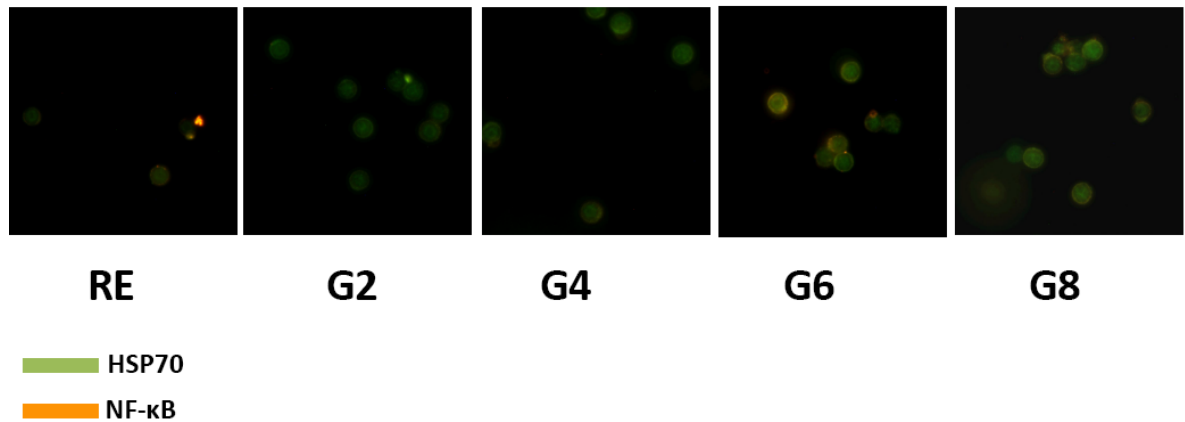


Figura 27 Marcação de linfócitos com anticorpo fluorescente anti- subunidade p50 do NF- κ B e anti HSP70 após o exercício físico

Sobreposição das imagens de microscopia com fluorescência para HSP70 (verde) e para NF- κ B (vermelho). A co-localização das fluorescência gera a imagem em tom alaranjado. Fotos do tempo zero: de Linfócitos retirados de linfonodo mesentéricos de ratos Wistar imediatamente após 20 minutos de natação em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período.

Foi avaliada a capacidade proliferativa dos linfócitos assim que extraídos nos animais. Embora em todos os grupos o estímulo com Concanavalina A tenha aumentado os níveis de proliferação celular, este efeito tornou-se absolutamente evidente nos linfócitos oriundos dos animais que realizaram intensidades moderadas de esforço (G4), dado reforçado pela linha de tendência aplicada ao gráfico (Figura 28).

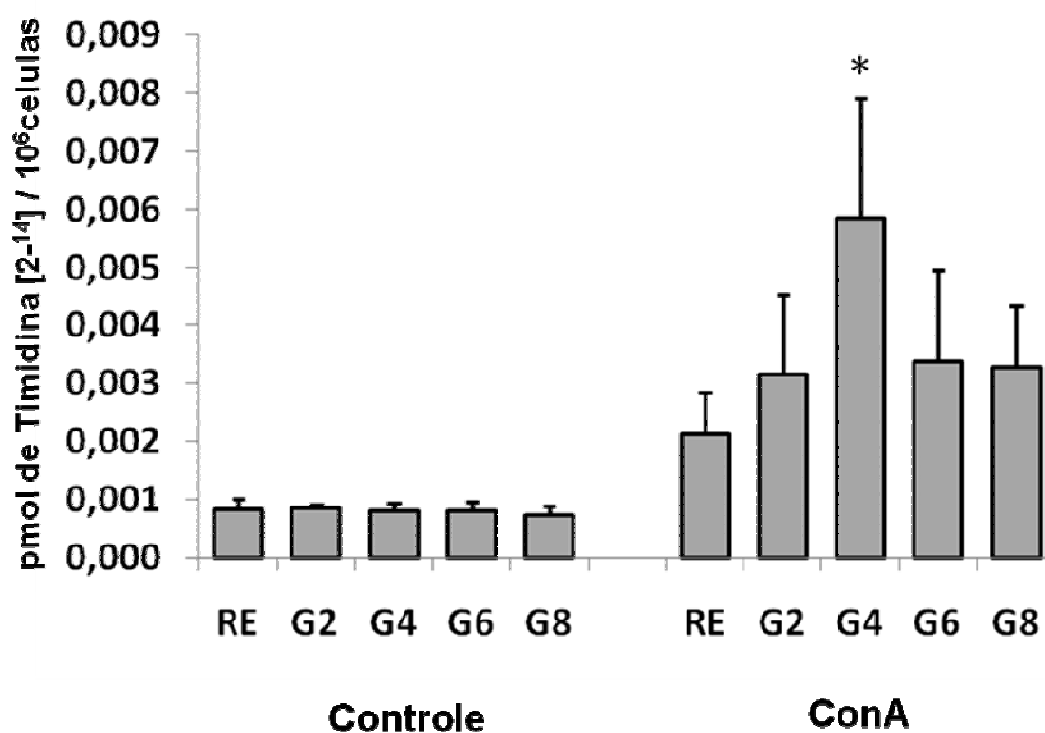


Figura 28. Proliferação de linfócitos retirados de linfonodo mesentérico de ratos Wistar após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades. Proliferação medida em pmol de Timidina [2-¹⁴] mensurada imediatamente após 20 minutos de natação em ratos Wistar em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período. Controle = proliferação não estimulada. ConA células tratadas com Concanavalina A imediatamente após a extração. *p<0,05 em relação ao G4 controle. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Quando avaliada a capacidade proliferativa somente após as 6h de cultura adicionais ao banho-maria, não houve diferença entre os grupos, embora índices de proliferação celular sejam sempre menores nos linfócitos submetidos ao choque térmico em comparação com as células mantidas a 37°C (Figura 29).

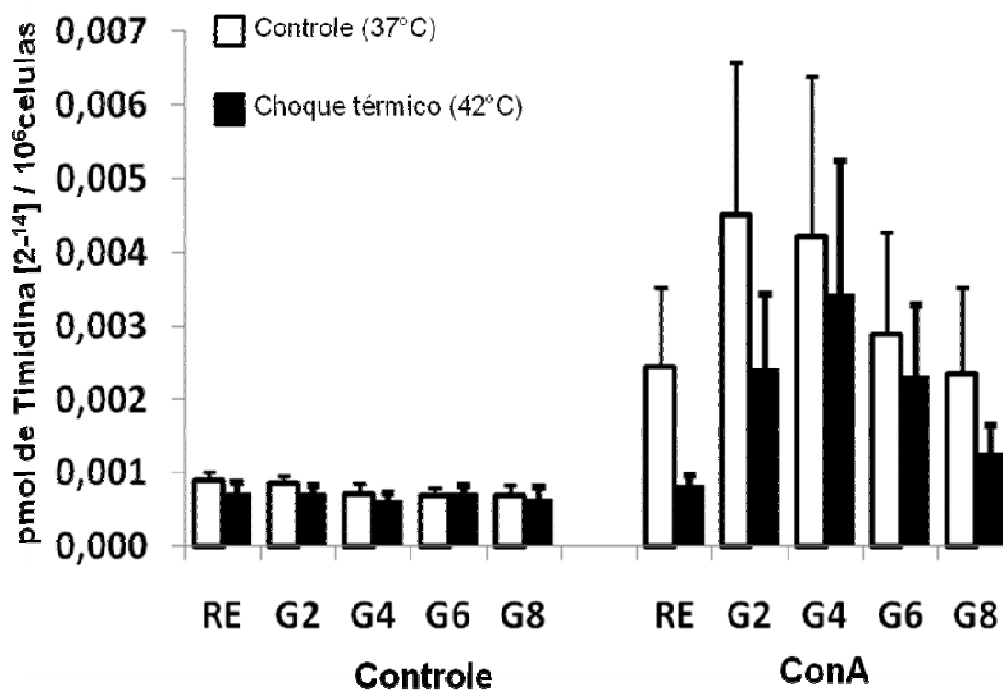


Figura 29 Proliferação de linfócitos submetidos ao choque térmico retirados de linfonodo mesentérico de ratos Wistar após 20 minutos de exercício de natação em diferentes intensidades.

Proliferação medida em pmol de Timidina [2^{-14}]/ 10^6 linfócitos mensurada em células submetidas ao choque térmico à 42°C (barras pretas) ou a situação controle (37°C) (barras brancas) em banho-maria por duas horas e mantidas em cultura por 6 horas adicionais. Células extraídas imediatamente após 20 minutos de natação em ratos Wistar em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período. Controle = proliferação não estimulada. ConA células tratadas com Concanavalina A imediatamente após a extração. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

De maneira conjunta, normalizando os dados de eHSP70, HSP70, proliferação celular e NF- κ B, em relação ao grupo RE no T6h nas células mantidas a 37°C, foi possível observar que o aumento da intensidade de exercício está relacionado com a diminuição da proliferação celular, simultaneamente a diminuição da ativação do NF- κ B e ao aumento do conteúdo celular de HSP70. O aumento da exportação de HSP70 para o meio extracelular acompanha o aumento intracelular até a intensidade de 6%, sendo que a exportação desta proteína é muito mais evidente nas células oriundas de animais que realizaram a maior intensidade de exercício G8 (figura 30).

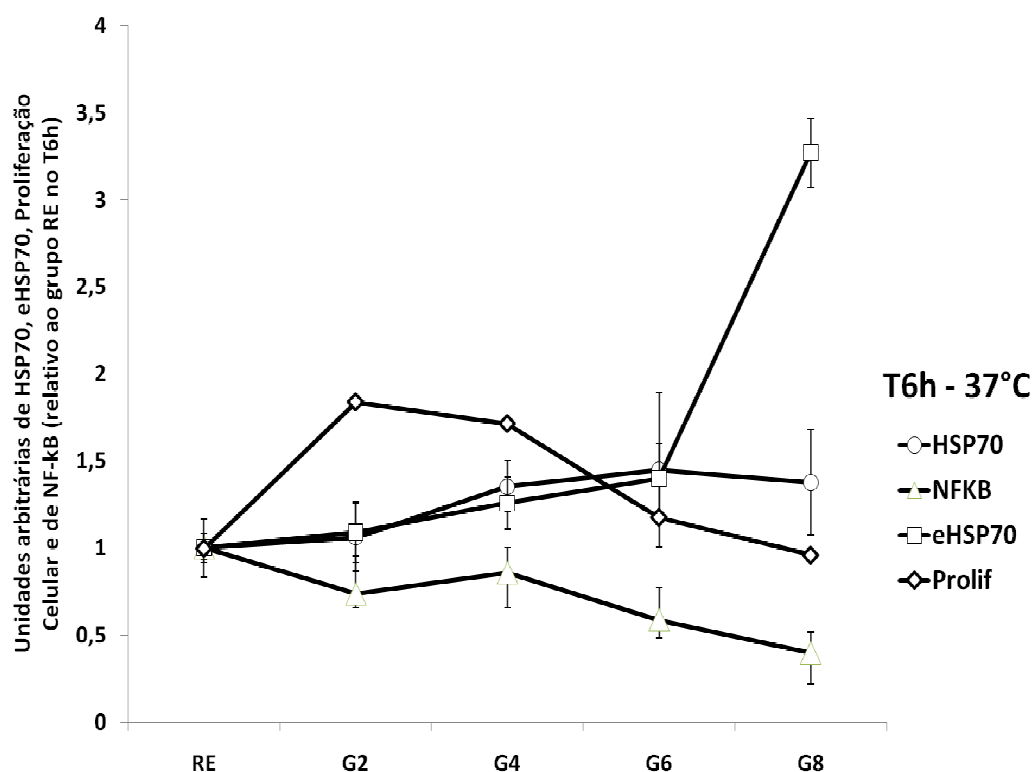


Figura 30 Relação entre os níveis de HSP70 celular, exportação de HSP70, proliferação celular e ativação de NF- κ B nas diferentes intensidades de exercício em linfócitos mantidos a 37°C em banho-maria e por 6h em cultura a 37°C.

Linfócitos retirados de linfonodos mesentéricos de ratos Wistar imediatamente após 20 minutos de natação em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período.

Nas células expostas ao choque térmico, os níveis de exportação de HSP70 já são elevados no grupo RE, aumentando ainda mais somente no grupo G8. Quanto a relação dos níveis proliferação, de HSP70 e de NF- κ B nas células expostas ao choque térmico não foi possível observar influencia da intensidade do exercício (figura 31).

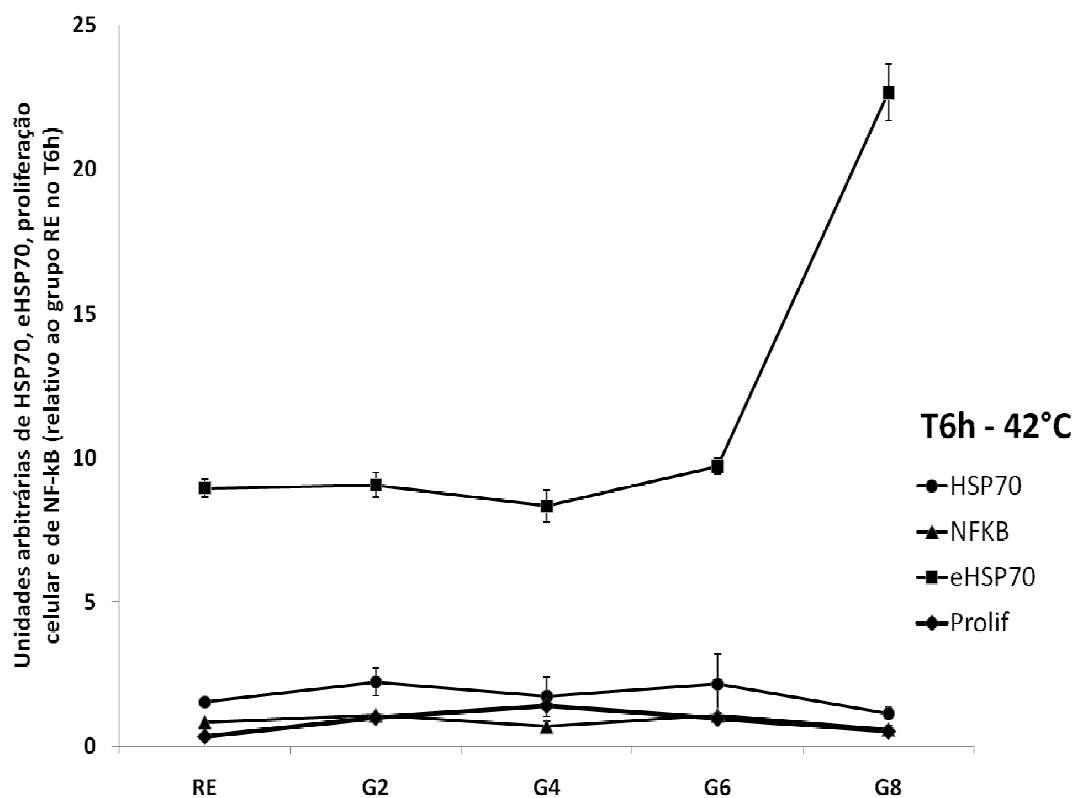


Figura 31 Relação entre os níveis de HSP70 celular, exportação de HSP70, proliferação celular e ativação de NF- κ B nas diferentes intensidades de exercício em linfócitos submetidos ao choque térmico a 42°C e permaneceram em cultura a 37°C por 6h.

Linfócitos retirados de linfonodos mesentéricos de ratos Wistar imediatamente após 20 minutos de natação em diferentes intensidades de acordo com peso adicionado a cauda do animal. G2=2% de carga; G4=4% de carga; G6=6% de carga e G8=8% de carga. (% = carga percentual do peso corporal de cada animal adicionada). RE= grupo de ratos que permaneceu em repouso pelo mesmo período.

DISCUSSÃO

Este estudo tem como base o uso do modelo experimental de exercício físico de natação em ratos Wistar. Este modelo de exercício é bastante usado em pesquisa, pois leva em consideração o fato de ser uma habilidade inata desta espécie além de ser possível observar alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em resposta ao exercício agudo (Silveira *et al.*, 2007), bem como adaptações do treinamento físico (Nunes *et al.*, 2008). Além disso, a realização deste tipo de experimento não requer equipamentos muito elaborados ou sofisticados, reduzindo os custos envolvidos na pesquisa (Kregel *et al.*, 2006).

A temperatura da água é um fator que pode influenciar o desempenho dos animais durante o exercício. Protocolos com água em temperaturas elevadas (42°C) ou muito baixas (20°C) causam efeitos conhecidos de hipertemia e hipotermia, respectivamente. Muitos modelos utilizam a água entre 30 e 32°C, considerando esta temperatura adequada para o protocolo de exercício (Gobatto *et al.*, 2001; Voltarelli *et al.*, 2002; Rogatto *et al.*, 2004; Voltarelli *et al.*, 2005; Manchado Fde *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2010). No entanto, os resultados neste estudo demonstram que a execução de exercício de natação nesta temperatura levou até mesmo a uma diminuição da temperatura corporal dos animais. Se por um lado alterar o protocolo para a temperatura da água entre 33 e 36°C possa representar uma adequação do modelo experimental para futuros estudos, minimizando o efeito hipotérmico do exercício realizado neste trabalho (Kregel *et al.*, 2006), por outro lado esta temperatura pode permitir aumento de temperatura corporal dos animais durante o exercício, efeito indesejado para este estudo que tem como foco proteínas de choque térmico. Assim, no presente estudo, a produção e exportação de HSP70 pôde ser avaliada independentemente das alterações de temperatura, já que o efeito da temperatura sobre a expressão de HSP70 só se dá com incrementos da temperatura central.

Em protocolos de natação, comportamento de nado de maneira contínua pode ser percebido tanto no nado sem uso de cargas, como com o uso de cargas leves até mesmo pesadas, produzindo um recrutamento muscular significativo tanto das patas anteriores como as posteriores, embora o recrutamento seja diferente de outros modelos como o exercício em esteira,

baseado na depleção de glicogênio muscular (Armstrong e Laughlin, 1983; Laughlin *et al.*, 1984). Neste sentido, foi verificada a utilização crescente do glicogênio muscular do músculo gastrocnêmio conforme a carga adicionada aos animais era maior. Este resultado sobre a concentração de glicogênio no músculo gastrocnêmio após o exercício representa uma boa avaliação da exigência muscular no modelo experimental utilizado, visto que o músculo sóleo não é exigido de maneira relevante durante a natação em ratos Wistar, diferentemente do modelo de exercício em esteira (Armstrong e Laughlin, 1983).

O tanque utilizado neste trabalho foi preenchido com água gerando a profundidade de 45 cm. Em um tanque similar (51 cm) ratos que nadaram por 20 min sem carga adicional apresentaram um demanda energética de 3 METs. Em tanques de natação mais rasos do que 50 cm, os animais que realizam natação sem carga apresentam comportamento de mergulhar e saltar, como forma de economia de energia, ficando 60% do tempo submersos. Cargas adicionadas na cauda dos animais como no presente estudo evitam este tipo de comportamento (Kregel *et al.*, 2006).

Especificamente sobre a execução do exercício no modelo de natação, os ratos desenvolvem um comportamento mais uniforme do que o apresentado no modelo de esteira, além da vantagem do exercício de natação não oferecer riscos de lesões nas patas dos animais, sendo menos fisicamente traumático do que os modelos de esteira (Kregel *et al.*, 2006). Uma potencial desvantagem da natação é a presença de comportamentos de fuga da situação de estresse, como mergulhar, por exemplo. No entanto a exposição prévia a situação de natação (período de adaptação realizado neste estudo) permite a redução ou ausência no deste comportamento, somado ao fato do uso de sobrecarga aplicado na base da cauda do animal no momento do experimento.

A concentração de lactato sanguíneo é utilizada como marcador de intensidade de exercício, tanto em humanos (Heck *et al.*, 1985; Hollmann, 2001) quanto em animais (Menezes *et al.*, 2010). Neste estudo foram utilizadas cargas de 2, 4, 6 e 8%, sendo que os valores de lactato após o exercício foram próximos a 5,0mmol/L nos grupos G2 e G4. Um trabalho semelhante, com a mesma temperatura da água (~30°C) e com a mesma duração do exercício (20 minutos),

sugere que a concentração máxima de estabilização do lactato sanguíneo em ratos sedentários seja de 5,5mmol/L, em cargas de até 6% (Gobatto *et al.*, 2001). O mesmo trabalho não identificou diferenças nas concentrações de lactato após o exercício em animais com cargas acima de 6% (cargas de 7, 8, 9 e 10% apresentaram valores próximos a 10mmol/L), enquanto os resultados obtidos neste trabalho foram próximos a 8,0mmol/L em G6 e pouco abaixo de 10mmol/L em grupo G8. Além disso, testes de concentração de lactato mínimo realizados em ratos submetidos a natação sugerem que a carga de trabalho equivalente à transição metabólica seja entre 4,89 e 5,05% de carga com uma concentração de lactato entre 6,41 e 6,50mmol/L (Voltarelli *et al.*, 2002; Voltarelli *et al.*, 2005).

O nado realizado de maneira contínua, sem cargas adicionadas, promove uma sessão de exercício com um consumo de oxigênio entre 46 e 63 mL·min⁻¹·kg de peso corporal. Como o consumo máximo de oxigênio em ratos normais varia entre 85 e 100 mL·min⁻¹·kg de peso corporal, a natação sem peso adicional é realizada entre 45 e 65% do consumo máximo de oxigênio. O aumento da intensidade, geralmente é proporcionado pela adição de cargas à cauda do animal, sendo que cargas de 4%, colocadas próximas a base da cauda dos ratos durante o nado promovem um esforço físico entre 65 e 70 % do consumo máximo de oxigênio (Kregel *et al.*, 2006). Deste modo, os resultados obtidos neste protocolo (quanto ao lactato sanguíneo e o consumo de glicogênio muscular) caracterizaram os grupos: RE como repouso, G2 como baixa, G4 como moderada, G6 como moderada a alta, e o grupo G8 como sendo de alta intensidade.

O foco deste estudo é a repercussão do exercício físico em diferentes intensidades na fisiologia de linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos de ratos. Neste trabalho, não foi observada influência do exercício na proliferação celular de linfócitos quando os mesmos não foram estimulados por Concanavalina A, similarmente aos resultados de um estudo com animais exercitados com a carga de 5% (Santos *et al.*, 2007). Entretanto, diante deste estímulo mitogênico (Con A), o grupo de intensidade moderada (G4) obteve maior aumento na proliferação celular. Os efeitos do exercício físico sobre os linfócitos mantidos em cultura são dependentes do órgão linfoide secundário do qual foram extraídas as células. Por exemplo linfócitos extraídos do baço e do linfonodos de ratos submetidos ao treinamento de natação com a carga de 6% (1h e 30 min por dia por 6 semanas) apresentam aumento da resposta proliferativa mesmo sem o estímulo com

Concanavalina A, enquanto os linfócitos extraídos do timo não apresentaram modificação neste parâmetro. Além disso, o mesmo estudo não demonstra diferença na proliferação celular de linfócitos de ratos entre as células extraídas de animais sedentários e treinados quando estimulados com Concanavalina A (Vitorino *et al.*, 2010).

A defasagem na resposta proliferativa dos linfócitos dos grupos G6 e G8 pode estar relacionada ao desafio imposto pela carga de exercício. Fatores limitantes como a presença de doenças como o diabetes também limitam a resposta proliferativa de linfócito frente a Concanavalina A. Além disso, o aumento do metabolismo celular não está diretamente relacionado ao aumento da resposta proliferativa de linfócitos (Miranda *et al.*, 2008). A importância em manter ou melhorar a capacidade proliferativa linfocitária através do exercício pode estar representada numa capacidade melhor de resposta ao desafio imunológico imposto como no caso do câncer (De Lima *et al.*, 2008).

De maneira histórica, os trabalhos envolvendo a análise da expressão de HSP70 na situação de exercício têm foco na análise do músculo esquelético ou cardíaco em animais submetidos a uma sessão de exercício até a exaustão (Salo *et al.*, 1991; Locke e Noble, 1995; , 2002; Noble *et al.*, 2006; Noble *et al.*, 2008). Tendo em vista a existência de isoformas de HSP70, é possível observar no músculo esquelético a diferença temporal na resposta do mRNA de HSP70, sendo uma resposta imediata ao esforço físico (mRNA de HSP72) com pico na expressão entre 30 e 60 minutos após a sessão de exercício) e uma resposta mais tardia e prolongada, que permanece em níveis elevados por até 6 h após o exercício (mRNA de HSP73)(Salo *et al.*, 1991). Resposta semelhante pode ser observada em humanos (Fischer *et al.*, 2006), sendo que o aumento da expressão de mRNA de HSP70 já ocorre no músculo antes mesmo do ponto de exaustão, e este aumento aparentemente está associado a utilização do glicogênio muscular e ao aumento da temperatura muscular (Febbraio e Koukoulas, 2000). Esta resposta aguda ao exercício pode ainda ser observada em animais mortos 24h após o exercício, onde o conteúdo tecidual de HSP70 tende a ser maior conforme a intensidade de exercício realizada no dia anterior (Milne e Noble, 2002).

Especificamente em células imunológicas, após a realização de meia-maratona, ocorre aumento de HSP72 em monócitos e granulócitos, mas não em linfócitos circulantes (Fehrenbach, Niess *et al.*, 2000; Fehrenbach, Passek *et al.*, 2000). Além disso, mononucleares circulantes expostos ao choque térmico de 40°C não apresentam aumento no conteúdo de HSP70 intracelular (Lancaster e Febbraio, 2005a). No presente trabalho, os linfócitos que foram retirados dos linfonodos mesentéricos dos animais após um protocolo de exercício, onde não houve aumento da temperatura corporal, e foram mantidos a 37°C por 8 horas (2h em banho-maria somados a 6h de cultura em estufa) apresentaram aumento no conteúdo celular de HSP70 no final do experimento (T6h) em torno de 50% nos grupos que realizaram maior intensidade de exercício (G6 e G8). Além disso, a intensidade de exercício levou ao aumento da expressão do mRNA tanto de HSP72 como de HSP73 no Tzero, mantendo-se elevados (acima de RE) durante todo o período de acompanhamento em cultura a 37°C (Tpós banho-maria e T6h). Portanto, os resultados sugerem que o exercício físico *per se*, mesmo que de curta duração, teve efeito no metabolismo dos linfócitos localizados nos linfonodos mesentéricos, visto que esse efeito foi observado *ex vivo*. Estes dados corroboram com evidências de que o exercício é capaz de induzir a expressão de HSP70 mesmo sem aumento de temperatura corporal por promover modificações nas concentrações intracelulares de ATP e de ADP e AMP, no consumo das reservas de carboidratos, por causar hipóxia ou isquemia tecidual ou por reduzir o pH celular (Locke e Noble, 2002). Por outro lado, no fígado o aumento da expressão de HSP70 em resposta ao exercício aparentemente não ocorre for realizado a 4°C (Ogura *et al.*, 2008). Já no músculo esquelético estes resultados são contraditórios, podendo ser independentes (Skidmore *et al.*, 1995) ou dependente da temperatura (Ogura *et al.*, 2008).

Os protocolos de choque térmico descritos na literatura têm grande variabilidade na relação entre o tempo de exposição (de 15 a 120 minutos) e temperatura (38 a 45°C), sendo que quanto maior a temperatura, menor é o tempo de exposição. Após o exercício físico, os linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos foram submetidos ao choque térmico a 42°C em banho-maria por duas horas, e esta temperatura foi utilizada por representar um limite fisiológico aceitável e praticado em outros estudos em animais anestesiados (Meyer e Silva, 1994; Chung *et al.*, 2008). A escolha do protocolo de choque térmico por duas horas (42°C) deve-se a

observação da indução de HSP70 em outros tipos celulares (Amici *et al.*, 1992). Neste estudo, as células extraídas dos animais que não realizaram exercício físico apresentaram pico no conteúdo celular de HSP70 4 horas após o choque-térmico. A manutenção das células em cultura a 37°C após o choque-térmico mostra em estudos anteriores que pico na síntese de HSP70 ocorre em torno de 4h, sendo o estímulo o choque térmico, o tratamento com prostaglandinas (Amici e Santoro, 1991; Amici *et al.*, 1992) ou fito-hemaglutinina (Ferris *et al.*, 1988). Na tentativa de comparar o efeito do exercício com o choque térmico sobre o conteúdo celular de HSP70 em mononucleares periféricos, um estudo realizado com humanos não foi capaz de identificar diferença entre os estímulos utilizando a temperatura central de 39°C por 90 minutos, nem mesmo foi possível verificar aumento de HSP70 nessas células (Lovell *et al.*, 2008), o que sugere que a temperatura de 42°C utilizada neste estudo seja adequada para verificar a indução de HSP70 (Hunter-Lavin *et al.*, 2004).

Tendo em vista que o próprio exercício físico, nos grupos de maior intensidade (G6 e G8), foi capaz de induzir a síntese de HSP70 nas células mantidas a 37°C, o tratamento com choque-térmico é visto como um segundo desafio imposto a estas células, subsequente ao desafio do exercício de alta intensidade. Enquanto o G6 apresentou uma capacidade aumentada de resposta ao choque-térmico comparativamente aos os demais grupos (conforme os dados de mRNA no Tzero e os dados de HSP70 no T6h sugerem, tanto a 37°C como a 42°C), o G8 não foi capaz de aumentar ainda mais o conteúdo celular de HSP70 além do já induzido pelo exercício físico sugerindo a existência de um “limite” para a capacidade de indução de HSP70, embora os níveis de mRNA estivessem aumentados neste grupo já em Tzero. Além disso, ocorreu a antecipação (em relação aos demais grupos) do momento de maior conteúdo intracelular observado no G8 em resposta ao choque térmico para duas horas após o choque (o grupo RE teve o pico em 4 horas após o choque, por exemplo). Este dado pode representar uma maior demanda por citoproteção nesse grupo, ou ainda o nível de desafio celular pode ter excedido um limiar de resposta ao estresse, limitando a resposta de síntese de HSP70 pela incapacidade de manter ativo o principal sensor para síntese de HSP70 o HSF1 (Batulan *et al.*, 2003), mesmo com níveis de mRNA elevados neste grupo em resposta ao choque. Outro aspecto importante é o fato de altas intensidades de exercício promoverem mudanças metabólicas em linfócitos de linfonodos

mesentéricos em cultura modificando o consumo de glicose e glutamato, mas principalmente por influenciar no metabolismo da glutamina, essencial para a proliferação de linfócitos e auxiliar na indução de HSP70 (Ziegler *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2007).

Mantidas em cultura, todas as células foram capazes de exportar HSP70 para o meio de cultura, sendo que o valor representativo de linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos de ratos foi de 0,36ng/h/10⁸ linfócitos (grupo RE), ou seja foi observado um acúmulo de 2,88ng/10⁸ linfócitos ou 1,44ng/mL em 8 horas de cultura. Mononucleares humanos mantidos em cultura a 37°C por 5 horas exportam cerca de 10 ng/ mL/10⁶ células, passando a exportar 5 vezes mais quando submetidas ao choque térmico de 43°C por 1 hora (Lancaster e Febbraio, 2005b). Os valores de exportação de HSP70 entre diferentes estudos é uma um parâmetro de difícil comparação, pelo fato de os protocolos de choque térmico serem muitos distintos, além dos diferentes tipos celulares utilizados. De maneira geral, células de cultura permanente ou de linhagens tumorais secretam quantidades maiores de HSP70 que células de culturas primárias (Ireland *et al.*, 2007). A quantidade de eHSP70 também pode mudar conforme a temperatura, **não sendo** diretamente proporcional à mesma, como por exemplo, em células Jurkat (originárias de linfoma T humano), a temperatura ótima para estimular a exportação de HSP70 é de 39°C, diminuindo a quantidade de eHSP70 com temperaturas maiores ou menores do que esta no tratamento de choque térmico por duas horas (Ireland *et al.*, 2007).

Em resposta ao choque térmico a 42°C por 2 horas, a quantidade de eHSP70 obtida no meio de cultura foi de 3,24ng/h/10⁸ linfócitos (grupo RE), aproximadamente 10 vezes mais do que o exportado normalmente por estas células. Efeito ainda mais pronunciado foi observado nas células do G8 expostas a 42°C, que exportaram 8,23 ng/h/10⁸ linfócitos enquanto as células do mesmo grupo mantidas a 37°C exportaram 1,19 ng/h/10⁸ linfócitos. Tendo em vista que em resposta ao choque térmico G8 foi o grupo que apresentou maiores concentrações de eHSP70, mas sem aumentar na mesma proporção o conteúdo intracelular de HSP70 mesmo tendo níveis normais de mRNA de HSP72 e HSP73, este conjunto de dados sugerem que a exportação de HSP70 possa realmente ter um limiar de intensidade de exercício. Estes resultados tornaram-se mais evidentes com a visualização das células não permeabilizadas e incubadas com anticorpo para HSP70 com fluorescência , onde a marcação foi cada vez menos intensa com o aumento da

intensidade de exercício e com o choque térmico. Embora a concentração de eHSP70 possa ser dependente da temperatura do ambiente durante o esforço físico, neste trabalho fica evidente que o grupo de maior intensidade foi capaz de elevar o nível de exportação basal (à 37°C) de HSP70 por linfócitos em cultura e também diante do desafio de choque térmico.

A incubação das células com anticorpo específico para HSP70, sem permeabilizá-las, e a revelação com DAB torna visível a identificação da presença desta proteína na membrana celular dos linfócitos extraídos de linfonodo mesentérico. Tanto o choque térmico, quanto o exercício de alta intensidade diminuem a intensidade da coloração sugerindo redução das quantidades desta proteína no momento da coloração devido à exportação para o meio extracelular, conforme observado na dosagem de eHSP70 no meio de cultura. Adicionalmente, parte das células de todos os grupos foram tratadas com β -metilciclodextrina (detergente de cavéolas), antes da incubação com o anticorpo e esse tratamento diminuiu também a coloração. Sendo este um agente farmacológico capaz de diminuir o colesterol de membranas e, portanto, inibir a função de balsas lipídicas, a ausência de marcação com este tratamento sugere que o mecanismo de exportação de HSP70 por linfócitos seja mesmo dependente de balsas lipídicas. O próprio tratamento com este fármaco durante a cultura é capaz de aumentar a concentração de HSP70 no meio extracelular de ~30ng/ mL para ~40ng/ mL em mononucleares expostos ao choque térmico, embora este efeito possa ser considerado um viés experimental devido a perda da integridade da membrana celular (Lancaster e Febbraio, 2005a). Estes mesmos autores sugerem que a via de exportação de HSP70 pelas células imunológicas seja por exossomos, conforme demonstrada por outros trabalhos, embora estudos ainda discutam a utilização de balsas lipídicas para exportação de HSP70 (Hunter-Lavin *et al.*, 2004; Asea, 2007; Mambula *et al.*, 2007; Multhoff, 2007; Vega *et al.*, 2008). Portanto, embora ainda sejam inconclusivos os estudos sobre os mecanismos de exportação de HSP70 por linfócitos, neste estudo o tratamento com beta-metilciclodextrina demonstrou a presença de HSP70 na membrana celular pronta para ser exportada, visto que a exportação de eHSP70 antecede tanto a expressão do mRNA quanto da proteína em resposta ao exercício (Febbraio, Ott *et al.*, 2002; Febbraio, Steensberg *et al.*, 2002).

Os efeito observados do exercício físico, somados ao tratamento com choque térmico na da ativação do NF- κ B avaliada em extratos nucleares sugere a manutenção deste fator de

transcrição na forma inativa, localizada no citoplasma dos linfócitos, efeito possível de ser observado na microscopia com a marcação com anticorpo anti-subunidade p50 do NF- κ B. A ativação do NF- κ B é considerado um ponto chave no disparo de processos inflamatórios, sendo alvo de desenvolvimento de estratégias terapêuticas para diversas doenças (Santoro *et al.*, 2003; Zingarelli *et al.*, 2003), inclusive em estudos sobre a resposta ao choque térmico (Malhotra e Wong, 2002) e sobre o exercício (Buford *et al.*, 2010). O entendimento da influência do exercício físico na regulação do NF- κ B em linfócitos de linfonodos mesentéricos passa a ser um tema de interesse na imunologia pelo fato de que o desenvolvimento dos tipos celulares são diretamente moldados pelo estado inflamatório do organismo (Cupedo, 2011).

Os resultados demonstram que, quando mantidos em cultura por 6 horas após o choque térmico, ocorre diminuição na ativação do NF- κ B em linfócitos. Em um estudo onde os animais foram mortos em tempos diferentes após o exercício exaustivo ocorreu diminuição na ativação deste fator nuclear imediatamente após o esforço no tecido adiposo, resultado semelhante aos deste trabalho, enquanto que nos animais mortos 6 horas após o exercício houve aumento na ativação do NF- κ B no tecido adiposo (Rosa *et al.*, 2011). Além de se tratar de diferentes tecidos, esta discrepância de resultados 6h após o exercício pode ser devido a estímulos pró-inflamatórios sistêmicos oriundo do próprio exercício (Pedersen *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 1998; Pedersen e Toft, 2000; Pedersen, 2006), ausentes nos linfócitos em cultura. O estilo de vida mais ativo também está associado a diminuição a ativação do NF- κ B (Buford *et al.*, 2010).

Detalhadamente, o exercício físico é capaz de modificar a ativação do NF- κ B de maneira independente quanto a suas subunidades. No músculo cardíaco, foi percebido o aumento da ativação do NF- κ B em animais exercitados quando comparados aos animais mantidos em repouso. Especificamente, a alta intensidade de exercício está associada à ativação da subunidade p65, enquanto que a ativação da subunidade p50 está mais associada ao exercício de baixa intensidade (Balan e Locke, 2011). Em conjunto com este estudo, os dados comparativos da ativação do NF- κ B sugerem a existência de limiares de intensidade de exercício entre a promoção de respostas anti-inflamatórias e respostas pró-inflamatórias.

A microscopia com fluorescência permitiu confirmar a localização celular tanto do NF- κ B quanto da HSP70 em linfócitos, fundamentalmente nas imagens sobrepostas. As imagens da localização da HSP70 são extremamente semelhantes a de outros estudos com linfócitos (Nadin *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2009) que sugere que além de exportar, esta célula seja capaz de captar a eHSP70 (Figueiredo *et al.*, 2009). Em células sob condições normais, é comum a marcação com fluorescência para HSP73 identificar esta proteína tanto no núcleo como no citoplasma. No entanto, em resposta ao choque térmico, a esta marcação torna-se evidente em nucléolos, tanto para HSP73 quanto para HSP72. Esta localização após o desafio térmico esta relacionada com a manutenção da integridade do núcleo e particularmente dos nucléolos, formando grânulos de HSP70 em regiões de montagem de subunidades ribossomais e pequenas ribonucleoproteínas, e esta localização coincide com a inibição da síntese de rRNA, sendo um efeito reversível. Após o choque térmico, as funções nucleares retomam as atividades normais enquanto a HSP70 se dissocia dos nucléolos, mas podendo permanecer no nucleoplasma (Martin *et al.*, 1993; Mayer e Brown, 2004; Nikfarjam *et al.*, 2005; Nadin *et al.*, 2007).

Além dos efeitos citoprotetores clássicos da HSP70, o aumento desta proteína no ambiente intracelular está associada à citoproteção e a mecanismos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos, reprimindo a expressão de genes e modulando a progressão do ciclo celular (Beere, 2005), efeito observado neste estudo na diminuição da captação de Timidina[2-¹⁴C] durante os experimento de proliferação celular. Neste sentido, a HSP70 apresenta um efeito inibitório sobre o NF- κ B por inibição da fosforilação dos inibidores do κ B (I κ Bs) (Ran *et al.*, 2004). Deste modo, a atividade repressora da HSP70 intracelular sobre o NF- κ B tem reflexo direto sobre reações inflamatórias (Feinstein *et al.*, 1996). Diante de desafios celulares extremos, com participação imunológica direta como no caso da sepse, a HSP70 intracelular é capaz de trazer benefícios por bloquear a ativação de genes como da iNOS, que são ativados pelo NF- κ B através da inibição da I κ B quinase e consequentemente inibição da degradação da subunidade I κ B (Chan *et al.*, 2004). A manutenção do complexo NF- κ B /I κ B no citossol, conforme observado nos dados de microscopia deste estudo, impede a transcrição de genes dependentes deste fator de transcrição nuclear, como os genes responsáveis pela síntese de TNF- α e iNOS (NOS-2), pode representar um mecanismo pelo qual o exercício possui propriedades anti-inflamatórias (Kim *et al.*, 1997;

Pedersen e Nieman, 1998; Rossi *et al.*, 2000; Homem De Bittencourt e Curi, 2001; Beere, 2004; Chan *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Pedersen, 2006). Além desses efeitos diretamente relacionados a inibição do NF- κ B, tratamento com indutores de HSP70, ou diretamente o choque térmico tem efeito protetor sobre o tecido cardíaco (Benjamin e Christians, 2002), intestinal (Yuan *et al.*, 2008), controle glicêmico (Atalay *et al.*, 2004; Bathaie *et al.*, 2010),

Por outro lado, a intensidade mais extrema de exercício realizada neste estudo propiciou um aumento na exportação de HSP70 para o ambiente extracelular. A presença de níveis elevados de eHSP70 esta associada a processos inflamatórios intensos, como no remodelamento cardíaco (Cai *et al.*, 2010), eventos de isquêmicos (Zou *et al.*, 2008) e diminuição do lúmen arterial (Matsumoto *et al.*, 2008), sendo coadjuvante na perda funcional do próprio sistema cardiovascular. Estes efeitos são dependentes da interação da eHSP70 com TLR-4 ou TLR2 (Asea *et al.*, 2002; Asea, 2003; , 2005; , 2006; , 2008; Wei *et al.*, 2009). O aumento de eHSP70 vem sendo constantemente associado ao grau de severidade, ou ao estágio de muitas doenças, como a baixa sobrevida em pacientes com insuficiência cardíaca (Genth-Zotz *et al.*, 2004) e na sepse (Gelain *et al.*, 2011), com aumento de risco cardiovascular (Dulin *et al.*, 2010), com o tempo de diagnóstico de Diabetes (Nakhjavani *et al.*, 2010), com problemas durante a gestação (Molvarec *et al.*, 2006; Molvarec *et al.*, 2007; Molvarec *et al.*, 2009; Molvarec *et al.*, 2010; Molvarec *et al.*, 2011), dislipidemias (Nakhjavani *et al.*, 2011), esclerose múltipla (Ogawa *et al.*, 2008), disfunções hepáticas e hematológicas (Madach *et al.*, 2008). Este aumento de eHSP70 leva a interação com receptores celulares (Calderwood, Mambula *et al.*, 2007; Calderwood, Theriault *et al.*, 2007), com propósito fisiológico, visto que ocorre exportação de HSP70 mesmo na ausência de ruptura celular (Lancaster e Febbraio, 2005a; Sun e Macrae, 2005). Aparentemente, a eHSP70 pode ser oriunda de diversos tecidos e células, inclusive durante o exercício físico (Walsh *et al.*, 2001; Febbraio, Ott *et al.*, 2002; Febbraio *et al.*, 2004; Lancaster *et al.*, 2004; Fehrenbach *et al.*, 2005; Lancaster e Febbraio, 2005b), com mecanismos diferentes de liberação de proteínas para o meio extracelular e diferentes indutores (Mambula *et al.*, 2007). Sendo a HSP72 é a maior representante das eHSP70, (De Maio, 2011), esta proteína pode ligar-se a receptores altamente conservados chamados receptores TLR-2 e TLR-4 gerando um uma situação pró-inflamatória por induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α e

a produção de NO via iNOS, efeitos desencadeados pela ativação do NF- κ B (Lathigra *et al.*, 1991; Engraber e Loos, 1992; Vabulas *et al.*, 2002). Portanto, ao serem “re-desafiados” com choque térmico, os linfócitos provenientes dos animais que realizaram exercício mais intenso podem estar mais propícios a desencadear processo pró-inflamatórios quando levado em consideração os altos níveis de eHSP70 no meio de cultura dessas células, pois a eHSP70 é capaz de gerar uma resposta citotóxica em linfócitos T auxiliares mesmo na ausência de um desafio imunológico como LPS, estimulando a própria proliferação celular de maneira semelhante ao desencadeado por IL-2 (Figueiredo *et al.*, 2009).

Neste trabalho, as células mantidas em cultura a 37°C, claramente respondem ao estímulo de proliferação celular de acordo com os níveis intracelulares de HSP70 induzidos pelo exercício, possivelmente contrabalanceando os efeitos contrários induzidos pela sinalização da eHSP70, visto que a localização da HSP70 representa funções fisiológicas antagônicas (Pockley e Multhoff, 2008; Pockley *et al.*, 2008). Como a suplementação com glutamina, eleva os níveis de eHSP70 e de HSP70 em linfócitos em pacientes e este efeito está relacionado com menor tempo de utilização de tratamento intensivo hospitalar (Ziegler *et al.*, 2005), além da eHSP70 ter efeitos protetores mesmo durante a sepse (Ostrov *et al.*, 2009; Rozhkova *et al.*, 2010). Esse conjunto de estudos sugere que a elevação dos níveis circulantes de HSP70 pode significar uma tentativa do organismo de armar uma resposta imunológica diante de alguma doença ou desordem fisiológica.

Os dados de HSP70 avaliados por *western blot* neste estudo foram normalizados pela expressão de actina e posteriormente os dados foram expressos em relação ao grupo RE no Tzero. Da mesma maneira, os dados de eHSP70 foram expressos em relação ao grupo RE, de modo que a razão eHSP70/HSP70 no grupo RE foi considerada de 1:1. Foi possível verificar que nas células mantidas a 37°C esta relação foi alterada apenas em G8 (~2:1). Em resposta ao choque térmico, esta relação passou para valores próximos a 5:1 em todos os grupos, confirmando ser uma resposta fisiológica ao choque térmico. Mas no entanto, em G8 esta razão passou a ser próxima de 20:1, sugerindo que a exposição em sequência de exercício de alta intensidade e de choque térmico levou os linfócitos destes animais a adquirirem um perfil de resposta pró-inflamatório. Este tipo de análise permitiu descrever que o aumento de eHSP70 se sobrepõe ao aumento de HSP70 em resposta ao choque térmico, o que indica a exportação de

HSP70 como uma resposta imediata a um desafio celular, enquanto a síntese de HSP70 representa uma resposta mais tardia. A resposta ao próprio choque térmico é distinta entre a eHSP70 e a HSP70: em mononucleares circulantes a temperatura ótima para que aumente a concentração de eHSP70 é de 39°C enquanto que o maior acúmulo de HSP70 intracelular ocorre nessas células quando submetidas a 42°C (Hunter-Lavin *et al.*, 2004). Adicionalmente, esta relação eHSP70/HSP70 pode ser um modelo para identificação da propensão do indivíduo a desenvolver processos inflamatórios, quando utilizado o conteúdo celular de HSP70 em linfócitos e o nível plasmático de eHSP70 como parâmetros (Yang *et al.*, 2007).

Portanto, há um equilíbrio necessário na razão eHSP70/HSP70, de modo a manter o controle sobre a ativação NF- κ B em linfócitos, tanto em condições patológicas quanto na realização de exercício físico, sendo o aumento exagerado desta razão eHSP70/HSP70 um sinal de alerta imunológico aos demais sistemas durante o próprio exercício (Heck *et al.*, 2011). Manter este equilíbrio passa a se tornar um desafio extremo para um organismo que realizou exercício de alta intensidade e posteriormente se encontra diante de um desafio. Sendo assim, a razão eHSP70/HSP70 pode constituir-se numa importante ferramenta de aferição clínica, tanto na situação de exercício como em outras situações de desafio ao organismo.

CONCLUSÃO

O exercício físico realizado por curta duração mas em alta intensidade foi capaz de induzir a síntese de HSP70 em linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos de ratos Wistar. O aumento do conteúdo celular de HSP70 está relacionado com a inativação do NF- κ B e diminuição da proliferação celular. Em altas intensidades ocorre a modificação da relação intra e extracelular de HSP70 em linfócitos, podendo esta relação ser um indicativo de uma intensidade limite de exercício. Este efeito da alta intensidade do exercício foi mais evidente quando os linfócitos foram desafiados com choque térmico logo após o animal ter realizado exercício.

Sendo a HSP70 intracelular anti-inflamatória, e a eHSP70 pró-inflamatória, o presente estudo demonstra haver uma relação entre a intensidade de exercício e propensão da resposta celular de linfócitos após uma sessão de exercício, sendo que intensidades moderadas de esforço físico mantêm esta relação eHSP70/HSP70 estável, mesmo diante de um desafio celular subsequente, como o choque térmico. Portanto a razão eHSP70/HSP70 é uma importante medida de uso clínico imediato, tanto na situação de exercício como em outras situações de desafio ao organismo.

Por fim, este trabalho sugere o uso da razão eHSP70/HSP70 intralinfocitária como um marcador de intensidade de exercício, fundamentalmente utilizando células imunológicas como parâmetro devido a possibilidade das mesmas usarem a HSP70 como sinal de alerta para o organismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. K., A. H. Lichtman, *et al.* Imunologia Básica - Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico: Revinter Ltda. 2003. 307 p.

Amici, C., C. Giorgi, *et al.* Selective inhibition of virus protein synthesis by prostaglandin A1: a translational block associated with HSP70 synthesis. J Virol, v.68, n.11, Nov, p.6890-9. 1994.

Amici, C. e M. G. Santoro. Suppression of virus replication by prostaglandin A is associated with heat shock protein synthesis. J Gen Virol, v.72 (Pt 8), Aug, p.1877-85. 1991.

Amici, C., L. Sistonen, *et al.* Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.14, Jul 15, p.6227-31. 1992.

Armstrong, L. E. Exertional Heat Illnesses: Human Kinetics. 2003. 275 p.

Armstrong, R. B. e M. H. Laughlin. Is rat soleus muscle recruited during swimming? Brain Research, v.258, p.173-176. 1983.

Asea, A. Chaperokine-induced signal transduction pathways. Exerc Immunol Rev, v.9, p.25-33. 2003.

Asea, A. Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72. Exerc Immunol Rev, v.11, p.34-45. 2005.

Asea, A. Initiation of the Immune Response by Extracellular Hsp72: Chaperokine Activity of Hsp72. Curr Immunol Rev, v.2, n.3, Aug, p.209-215. 2006.

Asea, A. Hsp72 release: mechanisms and methodologies. Methods, v.43, n.3, Nov, p.194-8. 2007.

Asea, A. Heat shock proteins and toll-like receptors. Handb Exp Pharmacol, n.183, p.111-27. 2008.

Asea, A., M. Rehli, *et al.* Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. J Biol Chem, v.277, n.17, Apr 26, p.15028-34. 2002.

Atalay, M., N. K. Oksala, *et al.* Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. J Appl Physiol, v.97, n.2, Aug, p.605-11. 2004.

Axsen, W. S., C. M. Styer, *et al.* Inhibition of heat shock protein expression by Helicobacter pylori. Microb Pathog, v.47, n.4, Oct, p.231-6. 2009.

Balan, M. e M. Locke. Acute exercise activates myocardial nuclear factor kappa B. Cell Stress Chaperones, v.16, n.1, Jan, p.105-11. 2011.

Bathaie, S. Z., A. Jafarnejad, *et al.* The effect of hot-tub therapy on serum Hsp70 level and its benefit on diabetic rats: a preliminary report. Int J Hyperthermia, v.26, n.6, p.577-85. 2010.

Batulan, Z., G. A. Shinder, *et al.* High threshold for induction of the stress response in motor neurons is associated with failure to activate HSF1. J Neurosci, v.23, n.13, Jul 2, p.5789-98. 2003.

Beere, H. M. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. J Cell Sci, v.117, n.Pt 13, Jun 1, p.2641-51. 2004.

Beere, H.M. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. J Clin Invest, v.115, n.10, Oct, p.2633-9. 2005.

Benjamin, I. J. e E. Christians. Exercise, estrogen, and ischemic cardioprotection by heat shock protein 70. Circ Res, v.90, n.8, May 3, p.833-5. 2002.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Buford, T. W., M. B. Cooke, *et al.* Effects of age and sedentary lifestyle on skeletal muscle NF-kappaB signaling in men. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, v.65, n.5, May, p.532-7. 2010.

Cai, W. F., X. W. Zhang, *et al.* Intracellular or extracellular heat shock protein 70 differentially regulates cardiac remodelling in pressure overload mice. Cardiovasc Res, v.88, n.1, Oct 1, p.140-9. 2010.

Calderwood, S. K. Cell Stress Proteins. New-York: Springer, v.7. 2007. 459 p. (Protein Reviews Series)

Calderwood, S. K., S. S. Mambula, *et al.* Extracellular heat shock proteins in cell signaling. FEBS Lett, v.581, n.19, Jul 31, p.3689-94. 2007.

Calderwood, S. K., J. Theriault, *et al.* Cell surface receptors for molecular chaperones. Methods, v.43, n.3, Nov, p.199-206. 2007.

Chan, J. Y., C. C. Ou, *et al.* Heat shock protein 70 confers cardiovascular protection during endotoxemia via inhibition of nuclear factor-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in the rostral ventrolateral medulla. Circulation, v.110, n.23, Dec 7, p.3560-6. 2004.

Chen, H. W., H. T. Kuo, *et al.* In vivo heat shock protein assembles with septic liver NF-kappaB/I-kappaB complex regulating NF-kappaB activity. Shock, v.24, n.3, Sep, p.232-8. 2005.

Chung, J., A. K. Nguyen, *et al.* HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.5, Feb 5, p.1739-44. 2008.

Cotto, J. J. e R. I. Morimoto. Stress-induced activation of the heat-shock response: cell and molecular biology of heat-shock factors. Biochem Soc Symp, v.64, p.105-18. 1999.

Cupedo, T. Human lymph node development: An inflammatory interaction. Immunol Lett, v.138, n.1, Jul, p.4-6. 2011.

De Lima, C., L. E. Alves, *et al.* Anaerobic exercise reduces tumor growth, cancer cachexia and increases macrophage and lymphocyte response in Walker 256 tumor-bearing rats. Eur J Appl Physiol, v.104, n.6, Dec, p.957-64. 2008.

De Maio, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. Cell Stress Chaperones, v.16, n.3, May, p.235-49. 2011.

Downes, C. P., C. R. Wolf, *et al.* Celular responses to stress. New Jersey: Princeton University Press. 1999. 171 p.

Droge, W. e R. Breitkreutz. Glutathione and immune function. Proc Nutr Soc, v.59, n.4, Nov, p.595-600. 2000.

Dulin, E., P. Garcia-Barreno, *et al.* Extracellular heat shock protein 70 (HSPA1A) and classical vascular risk factors in a general population. Cell Stress Chaperones, v.15, n.6, Nov, p.929-37. 2010.

Engraber, M. e M. Loos. A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. Infect Immun, v.60, n.8, Aug, p.3072-8. 1992.

Erbse, A., M. P. Mayer, *et al.* Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones. Biochem Soc Trans, v.32, n.Pt 4, Aug, p.617-21. 2004.

Febbraio, M. A. e I. Koukoulas. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. J Appl Physiol, v.89, n.3, Sep, p.1055-60. 2000.

Febbraio, M. A., J. L. Mesa, *et al.* Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans. Cell Stress Chaperones, v.9, n.4, Winter, p.390-6. 2004.

Febbraio, M. A., P. Ott, *et al.* Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. J Physiol, v.544, n.Pt 3, Nov 1, p.957-62. 2002.

Febbraio, M. A., A. Steensberg, *et al.* Reduced glycogen availability is associated with an elevation in HSP72 in contracting human skeletal muscle. J Physiol, v.538, n.Pt 3, Feb 1, p.911-7. 2002.

Feder, M. E. e G. E. Hofmann. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu Rev Physiol, v.61, p.243-82. 1999.

Fehrenbach, E., A. M. Niess, *et al.* Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners. J Appl Physiol, v.89, n.2, Aug, p.704-10. 2000.

Fehrenbach, E., Niess, A.M. . Exercise intensity and duration affect blood soluble HSP72. Int J Sports Med, v.26, n.7, Sep, p.552-7. 2005.

Fehrenbach, E., F. Passek, *et al.* HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. Med Sci Sports Exerc, v.32, n.3, Mar, p.592-600. 2000.

Feinstein, D. L., E. Galea, *et al.* Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric-oxide synthase expression by decreasing NFkappaB activation. J Biol Chem, v.271, n.30, Jul 26, p.17724-32. 1996.

Ferris, D. K., A. Harel-Bellan, *et al.* Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.85, n.11, Jun, p.3850-4. 1988.

Figueiredo, C., M. Wittmann, *et al.* Heat shock protein 70 (HSP70) induces cytotoxicity of T-helper cells. Blood, Nov 18. 2008.

Fischer, C. P., N. J. Hiscock, *et al.* Vitamin E isoform-specific inhibition of the exercise-induced heat shock protein 72 expression in humans. J Appl Physiol, v.100, n.5, May, p.1679-87. 2006.

Fisher-Wellman, K. e R. J. Bloomer. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. Dyn Med, v.8, p.1. 2009.

Gelain, D. P., M. A. De Bittencourt Pasquali, *et al.* Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. Shock, v.35, n.5, May, p.466-70. 2011.

Genth-Zotz, S., A. P. Bolger, *et al.* Heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure: relation to disease severity and survival. Int J Cardiol, v.96, n.3, Sep, p.397-401. 2004.

Gmunder, H., H. P. Eck, *et al.* Macrophages regulate intracellular glutathione levels of lymphocytes. Evidence for an immunoregulatory role of cysteine. Cell Immunol, v.129, n.1, Aug, p.32-46. 1990.

Gmunder, H., S. Roth, *et al.* Interleukin-2 mRNA expression, lymphokine production and DNA synthesis in glutathione-depleted T cells. Cell Immunol, v.130, n.2, Oct 15, p.520-8. 1990.

Gobatto, C. A., M. A. De Mello, *et al.* Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.130, n.1, Aug, p.21-7. 2001.

Goldim, J. R. Pesquisa em Saúde: Leis Normas e Diretrizes Porto Alegre: HCPA. 1995. 68 p.

Gonzalez, B. e R. Manso. Induction, modification and accumulation of HSP70s in the rat liver after acute exercise: early and late responses. J Physiol, v.556, n.Pt 2, Apr 15, p.369-85. 2004.

Hamilton, K. L., J. L. Staib, *et al.* Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. Free Radic Biol Med, v.34, n.7, Apr 1, p.800-9. 2003.

Harris, M. B. e J. W. Starnes. Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.280, n.5, May, p.H2271-80. 2001.

Heck, H., A. Mader, *et al.* Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. Int J Sports Med, v.6, n.3, Jun, p.117-30. 1985.

Heck, T. G., C. M. Scholer, *et al.* HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? Cell Biochem Funct, v.29, n.3, Apr, p.215-26. 2011.

Hernando, R. e R. Manso. Muscle fibre stress in response to exercise: synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. Eur J Biochem, v.243, n.1-2, Jan 15, p.460-7. 1997.

Hochachka, P. S., Gn. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution: Oxford University Press. 2002. 480 p.

Hollmann, W. 42 years ago--development of the concepts of ventilatory and lactate threshold. Sports Med, v.31, n.5, p.315-20. 2001.

Homem De Bittencourt, P. I., Jr. e R. Curi. Antiproliferative prostaglandins and the MRP/GS-X pump role in cancer immunosuppression and insight into new strategies in cancer gene therapy. Biochem Pharmacol, v.62, n.7, Oct 1, p.811-9. 2001.

Homem De Bittencourt, P. I. J., C. M. Peres, *et al.* Pyruvate is a lipid precursor for rat lymphocytes in culture: evidence for a lipid exporting capacity. Biochem Mol Biol Int, v.30, n.4, Jul, p.631-41. 1993.

Hu, B., M. P. Mayer, *et al.* Modeling Hsp70-mediated protein folding. Biophys J, v.91, n.2, Jul 15, p.496-507. 2006.

Hunter-Lavin, C., E. L. Davies, *et al.* Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. Biochem Biophys Res Commun, v.324, n.2, Nov 12, p.511-7. 2004.

Ireland, H. E., F. Leoni, *et al.* Measuring the secretion of heat shock proteins from cells. Methods, v.43, n.3, Nov, p.176-83. 2007.

Jaattela, M. Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. J Immunol, v.151, n.8, Oct 15, p.4286-94. 1993.

Janeway, C., P. Travers, *et al.* Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença. Porto Alegre: Artmed. 2007. 824 p.

Johnson, J. D. e M. Fleshner. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. J Leukoc Biol, v.79, n.3, Mar, p.425-34. 2006.

Kayani, A. C., G. L. Close, *et al.* Enhanced recovery from contraction-induced damage in skeletal muscles of old mice following treatment with the heat shock protein inducer 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin. Rejuvenation Res, v.11, n.6, Dec, p.1021-30. 2008.

Kelly, D. A., P. M. Tiidus, *et al.* Effect of vitamin E deprivation and exercise training on induction of HSP70. J Appl Physiol, v.81, n.6, Dec, p.2379-85. 1996.

Kim, Y. M., M. E. De Vera, *et al.* Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. J Biol Chem, v.272, n.2, Jan 10, p.1402-11. 1997.

Kregel, K. C., D. L. Allen, *et al.* Resource Book for the Animal Exercise Protocols: American physiological Society 2006

Kregel, K. C. e P. L. Moseley. Differential effects of exercise and heat stress on liver HSP70 accumulation with aging. J Appl Physiol, v.80, n.2, Feb, p.547-51. 1996.

Kroeger, P. E. e R. I. Morimoto. Selection of new HSF1 and HSF2 DNA-binding sites reveals difference in trimer cooperativity. Mol Cell Biol, v.14, n.11, Nov, p.7592-603. 1994.

Lancaster, G. I. e M. A. Febbraio. Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. J Biol Chem, v.280, n.24, Jun 17, p.23349-55. 2005a.

Lancaster, G.I. e Febbraio, M.A. Mechanisms of stress-induced cellular HSP72 release: implications for exercise-induced increases in extracellular HSP72. Exerc Immunol Rev, v.11, p.46-52. 2005b.

Lancaster, G. I., K. Moller, *et al.* Exercise induces the release of heat shock protein 72 from the human brain in vivo. Cell Stress Chaperones, v.9, n.3, Autumn, p.276-80. 2004.

Lathigra, R. B., P. D. Butcher, *et al.* Heat shock proteins as virulence factors of pathogens. Curr Top Microbiol Immunol, v.167, p.125-43. 1991.

Laughlin, M. H., S. J. Mohrman, *et al.* Muscular blood flow distribution patterns in the hindlimb of swimming rats. Am J Physiol, v.246, n.3 Pt 2, Mar, p.H398-403. 1984.

Lin, Y. S., M. S. Jan, *et al.* Immunomodulatory effects of acute exercise bout in sedentary and trained rats. Med Sci Sports Exerc, v.27, n.1, Jan, p.73-8. 1995.

Lindquist, S. e E. A. Craig. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet, v.22, p.631-77. 1988.

Locke, M. e E. G. Noble. Stress proteins: the exercise response. Can J Appl Physiol, v.20, n.2, Jun, p.155-67. 1995.

Locke, M e Noble, E.G. Exercise and Stress Response: The Role of Stress Proteins. New York: CRC press. 2002. 226 p.

Locke, M., E. G. Noble, *et al.* Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. Am J Physiol, v.268, n.6 Pt 1, Jun, p.C1387-94. 1995.

Lovell, R., L. Madden, *et al.* Effects of active and passive hyperthermia on heat shock protein 70 (HSP70). Amino Acids, v.34, n.2, Feb, p.203-11. 2008.

Macellaro, A., E. Tujulin, *et al.* Identification of a 71-kilodalton surface-associated Hsp70 homologue in *Coxiella burnetii*. Infect Immun, v.66, n.12, Dec, p.5882-8. 1998.

Mackowiak, P. A. Concepts of fever. Arch Intern Med, v.158, n.17, Sep 28, p.1870-81. 1998.

Mackowiak, P.A. What We Do When We Suppress Fever. Curr Infect Dis Rep, v.7, n.1, Jan, p.1-4. 2005.

Mackowiak, P. A., J. G. Bartlett, *et al.* Concepts of fever: recent advances and lingering dogma. Clin Infect Dis, v.25, n.1, Jul, p.119-38. 1997.

Madach, K., A. Molvarec, *et al.* Elevated serum 70 kDa heat shock protein level reflects tissue damage and disease severity in the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, v.139, n.2, Aug, p.133-8. 2008.

Malhotra, V. e H. R. Wong. Interactions between the heat shock response and the nuclear factor-kappa B signaling pathway. Crit Care Med, v.30, n.1 Suppl, Jan, p.S89-95. 2002.

Mambula, S. S., M. A. Stevenson, *et al.* Mechanisms for Hsp70 secretion: crossing membranes without a leader. Methods, v.43, n.3, Nov, p.168-75. 2007.

Manchado Fde, B., C. A. Gobatto, *et al.* Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. Appl Physiol Nutr Metab, v.31, n.6, Dec, p.731-6. 2006.

Martin, F., J. M. Requena, *et al.* Cytoplasmic-nuclear translocation of the Hsp70 protein during environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. Biochem Biophys Res Commun, v.196, n.3, Nov 15, p.1155-62. 1993.

Matsumoto, M., P. C. Dimayuga, *et al.* Exogenous heat shock protein-70 inhibits cigarette smoke-induced intimal thickening. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.295, n.4, Oct, p.R1320-7. 2008.

Mayer, J. e I. Brown. Heat Shock Proteins in the Nervous System. London: Academic Press. 2004. 297 p.

Menezes, H. S., J. C. D. Coracini, *et al.* Ácido Láctico como Indicativo de Aptidão física em Ratos. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v.16, n.3, p.210-214. 2010.

Meyer, T. N. e A. C. Silva. A simple experimental model of heat shock response in rats. Acta Cir Bras, v.13, n.4, p.217-221. 1994.

Milne, K. J. e E. G. Noble. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. J Appl Physiol, v.93, n.2, Aug, p.561-8. 2002.

Miranda, D. T., V. G. Batista, *et al.* Soy lecithin supplementation alters macrophage phagocytosis and lymphocyte response to concanavalin A: a study in alloxan-induced diabetic rats. Cell Biochem Funct, v.26, n.8, Dec, p.859-65. 2008.

Molvarec, A., Z. Prohaszka, *et al.* Association of elevated serum heat-shock protein 70 concentration with transient hypertension of pregnancy, preeclampsia and superimposed preeclampsia: a case-control study. J Hum Hypertens, v.20, n.10, Oct, p.780-6. 2006.

Molvarec, A., J. Rigo, Jr., *et al.* Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. Cell Stress Chaperones, v.14, n.2, Mar, p.151-9. 2009.

Molvarec, A., J. Rigo, Jr., *et al.* Serum heat shock protein 70 levels are decreased in normal human pregnancy. J Reprod Immunol, v.74, n.1-2, Jun, p.163-9. 2007.

Molvarec, A., A. Szarka, *et al.* Serum heat shock protein 70 levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in women with preeclampsia. Clin Chim Acta, Jul 6. 2011.

Molvarec, A., L. Tamasi, *et al.* Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. Cell Stress Chaperones, v.15, n.3, May, p.237-47. 2010.

Morimoto, R., A. Tissieres, *et al.* Stress Proteins in Biology and Medicine. New York: Cold Spring Harbor 1990. 450 p. (Monograph Series)

Morimoto, R. I., K. D. Sarge, *et al.* Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. J Biol Chem, v.267, n.31, Nov 5, p.21987-90. 1992.

Morton, J. P., D. P. Maclaren, *et al.* Elevated core and muscle temperature to levels comparable to exercise do not increase heat shock protein content of skeletal muscle of physically active men. Acta Physiol (Oxf), v.190, n.4, Aug, p.319-27. 2007.

Multhoff, G. Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. Methods, v.43, n.3, Nov, p.229-37. 2007.

Murlasits, Z., R. G. Cutlip, *et al.* Resistance training increases heat shock protein levels in skeletal muscle of young and old rats. Exp Gerontol, v.41, n.4, Apr, p.398-406. 2006.

Nadin, S. B., L. M. Vargas-Roig, *et al.* Hsp27, Hsp70 and mismatch repair proteins hMLH1 and hMSH2 expression in peripheral blood lymphocytes from healthy subjects and cancer patients. Cancer Lett, v.252, n.1, Jul 8, p.131-46. 2007.

Nakai, A. e R. I. Morimoto. Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. Mol Cell Biol, v.13, n.4, Apr, p.1983-97. 1993.

Nakai, A., M. Tanabe, *et al.* HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. Mol Cell Biol, v.17, n.1, Jan, p.469-81. 1997.

Nakhjavani, M., A. Morteza, *et al.* Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes. Cell Stress Chaperones, v.15, n.6, Nov, p.959-64. 2010.

Nakhjavani, M. Morteza, A. *et al.* Serum heat shock protein 70 and oxidized LDL in patients with type 2 diabetes: does sex matter? Cell Stress Chaperones, v.16, n.2, Mar, p.195-201. 2011.

Nieman, D. C. Exercise, infection, and immunity. Int J Sports Med, v.15 Suppl 3, Oct, p.S131-41. 1994.

Nikfarjam, M., V. Muralidharan, *et al.* Patterns of heat shock protein (HSP70) expression and Kupffer cell activity following thermal ablation of liver and colorectal liver metastases. Int J Hyperthermia, v.21, n.4, Jun, p.319-32. 2005.

Noble, E. G., R. Ho, *et al.* Exercise is the primary factor associated with Hsp70 induction in muscle of treadmill running rats. Acta Physiol (Oxf), v.187, n.4, Aug, p.495-501. 2006.

Noble, E. G., K. J. Milne, *et al.* Heat shock proteins and exercise: a primer. Appl Physiol Nutr Metab, v.33, n.5, Oct, p.1050-65. 2008.

Nunes, R. B., M. Tonetto, *et al.* Physical exercise improves plasmatic levels of IL-10, left ventricular end-diastolic pressure, and muscle lipid peroxidation in chronic heart failure rats. J Appl Physiol, v.104, n.6, Jun, p.1641-7. 2008.

Ogawa, F., K. Shimizu, *et al.* Serum levels of heat shock protein 70, a biomarker of cellular stress, are elevated in patients with systemic sclerosis: association with fibrosis and vascular damage. Clin Exp Rheumatol, v.26, n.4, Jul-Aug, p.659-62. 2008.

Ogura, Y., H. Naito, *et al.* Elevation of body temperature is an essential factor for exercise-increased extracellular heat shock protein 72 level in rat plasma. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.294, n.5, May, p.R1600-7. 2008.

Oliveira, C. A. M., E. Luciano, *et al.* Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. Journal of Diabetes and Its Complications, v.21, p.258-264. 2007.

Ostrov, V. F., G. A. Slashcheva, *et al.* Effect of human recombinant and bovine heat shock proteins (70 kDa) on hemodynamics and hemostasis in endotoxin shock in rats. Dokl Biochem Biophys, v.429, Nov-Dec, p.320-2. 2009.

Parham, P. O Sistema Imune. Porto Alegre: Artmed. 2001. 229 p.

Paroo, Z. e E. G. Noble. Isoproterenol potentiates exercise-induction of Hsp70 in cardiac and skeletal muscle. Cell Stress Chaperones, v.4, n.3, Sep, p.199-204. 1999.

Pedersen, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease control. Essays Biochem, v.42, p.105-17. 2006.

Pedersen, B. K., H. Bruunsgaard, *et al.* Exercise-induced immunomodulation--possible roles of neuroendocrine and metabolic factors. Int J Sports Med, v.18 Suppl 1, Mar, p.S2-7. 1997.

Pedersen, B. K. e D. C. Nieman. Exercise immunology: integration and regulation. Immunol Today, v.19, n.5, May, p.204-6. 1998.

Pedersen, B. K., K. Ostrowski, *et al.* The cytokine response to strenuous exercise. Can J Physiol Pharmacol, v.76, n.5, May, p.505-11. 1998.

Pedersen, B. K. e A. D. Toft. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. Br J Sports Med, v.34, n.4, Aug, p.246-51. 2000.

Piva, R., G. Belardo, *et al.* NF-kappaB: a stress-regulated switch for cell survival. Antioxid Redox Signal, v.8, n.3-4, Mar-Apr, p.478-86. 2006.

Playfair, J. H. L. e B. M. Chain. Compêndio de Imunologia. Lisboa: Instituto Piaget. 2009. 196 p.

Pockley, A. G. e G. Multhoff. Cell stress proteins in extracellular fluids: friend or foe? Novartis Found Symp, v.291, p.86-95; discussion 96-100, 137-40. 2008.

Pockley, A. G., M. Muthana, *et al.* The dual immunoregulatory roles of stress proteins. Trends Biochem Sci, v.33, n.2, Feb, p.71-9. 2008.

Ran, R., A. Lu, *et al.* Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. Genes Dev, v.18, n.12, Jun 15, p.1466-81. 2004.

Ritossa, F. Discovery of the heat shock response. Cell Stress Chaperones, v.1, n.2, Jun, p.97-8. 1996.

Rogatto, G. P., C. A. Machado De Oliveira, *et al.* Respostas metabólicas agudas de ratos Wistar ao exercício intermitente de saltos. Motriz, v.10, n.2, p.61-66. 2004.

Rogers, C. J., D. A. Zaharoff, *et al.* Exercise enhances vaccine-induced antigen-specific T cell responses. Vaccine, v.26, n.42, Oct 3, p.5407-15. 2008.

Rosa, J. C., F. S. Lira, *et al.* Exhaustive exercise increases inflammatory response via Toll like receptor-4 and NF-kappaBp65 pathway in rat adipose tissue. J Cell Physiol, v.226, n.6, Jun, p.1604-7. 2011.

Rossi, A., P. Kapahi, *et al.* Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. Nature, v.403, n.6765, Jan 6, p.103-8. 2000.

Rozhkova, E., M. Yurinskaya, *et al.* Exogenous mammalian extracellular HSP70 reduces endotoxin manifestations at the cellular and organism levels. Ann N Y Acad Sci, v.1197, p.94-107. 2010.

Salo, D. C., C. M. Donovan, *et al.* HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. Free Radic Biol Med, v.11, n.3, p.239-46. 1991.

Santoro, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. Biochem Pharmacol, v.59, n.1, Jan 1, p.55-63. 2000.

Santoro, M. G., A. Rossi, *et al.* NF-kappaB and virus infection: who controls whom. Embo J, v.22, n.11, Jun 2, p.2552-60. 2003.

Santos, R. V., E. C. Caperuto, *et al.* Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. Life Sci, v.80, n.6, Jan 16, p.573-8. 2007.

Sarge, K. D., V. Zimarino, *et al.* Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. Genes Dev, v.5, n.10, Oct, p.1902-11. 1991.

Silveira, E. M., M. F. Rodrigues, *et al.* Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF-kappaB pathways. Cell Biochem Funct, v.25, n.1, Jan-Feb, p.63-73. 2007.

Simar, D., D. Malatesta, *et al.* Physical activity modulates heat shock protein-72 expression and limits oxidative damage accumulation in a healthy elderly population aged 60-90 years. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, v.62, n.12, Dec, p.1413-9. 2007.

Sistonen, L., K. D. Sarge, *et al.* Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. Mol Cell Biol, v.14, n.3, Mar, p.2087-99. 1994.

Sistonen, L., Sarge, K.D. Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. Mol Cell Biol, v.12, n.9, Sep, p.4104-11. 1992.

Skidmore, R., J. A. Gutierrez, *et al.* HSP70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. Am J Physiol, v.268, n.1 Pt 2, Jan, p.R92-7. 1995.

Smolka, M. B., C. C. Zoppi, *et al.* HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.279, n.5, Nov, p.R1539-45. 2000.

Staib, J. L., J. C. Quindry, *et al.* Increased temperature, not cardiac load, activates heat shock transcription factor 1 and heat shock protein 72 expression in the heart. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.292, n.1, Jan, p.R432-9. 2007.

Sun, Y. e T. H. Macrae. The small heat shock proteins and their role in human disease. Febs J, v.272, n.11, Jun, p.2613-27. 2005.

Terry, D. F., M. McCormick, *et al.* Cardiovascular disease delay in centenarian offspring: role of heat shock proteins. Ann N Y Acad Sci, v.1019, Jun, p.502-5. 2004.

Theodorakis, N. G., D. J. Zand, *et al.* Hemin-induced transcriptional activation of the HSP70 gene during erythroid maturation in K562 cells is due to a heat shock factor-mediated stress response. Mol Cell Biol, v.9, n.8, Aug, p.3166-73. 1989.

Tissieres, A., H. K. Mitchell, *et al.* Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. J Mol Biol, v.84, n.3, Apr 15, p.389-98. 1974.

Tupling, A. R., E. Bombardier, *et al.* Muscle fiber type-specific response of Hsp70 expression in human quadriceps following acute isometric exercise. J Appl Physiol, v.103, n.6, Dec, p.2105-11. 2007.

Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, *et al.* HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. J Biol Chem, v.277, n.17, Apr 26, p.15107-12. 2002.

Van Eden, W. e D. B. Young. Stress Proteins In Medicine. New York: Dekker. 1996. 578 p.

Vega, V. L., M. Rodriguez-Silva, *et al.* Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. J Immunol, v.180, n.6, Mar 15, p.4299-307. 2008.

Vitorino, D. C., C. F. Buzzachera, *et al.* Effect of chronic supplementation with shark liver oil on immune responses of exercise-trained rats. Eur J Appl Physiol, v.108, n.6, Apr, p.1225-32. 2010.

Voltarelli, F. A., C. A. Gobatto, *et al.* Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. Braz J Med Biol Res, v.35, n.11, Nov, p.1389-94. 2002.

Voltarelli, F. A., M. A. Rostom De Mello, *et al.* Transição metabólica e teste do lactato mínimo em ratos: nova proposta de quantificação do esforço. Revista de Educação Física da Universidade Estadual de Maringá v.16, n.1, p.73-78. 2005.

Walsh, R. C., I. Koukoulas, *et al.* Exercise increases serum Hsp72 in humans. Cell Stress Chaperones, v.6, n.4, Oct, p.386-93. 2001.

Wei, Y. J., Y. X. Huang, *et al.* Proteomic analysis reveals significant elevation of heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure due to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Mol Cell Biochem, v.332, n.1-2, Dec, p.103-11. 2009.

Weineck, J. Biologia do Esporte. Barueri, São Paulo: Manole. 2005. 758 p.

Woods, J., Q. Lu, *et al.* Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise-induced modulation of macrophage function. Immunol Cell Biol, v.78, n.5, Oct, p.545-53. 2000.

Yang, X., J. Zheng, *et al.* Using lymphocyte and plasma Hsp70 as biomarkers for assessing coke oven exposure among steel workers. Environ Health Perspect, v.115, n.11, Nov, p.1573-7. 2007.

Yuan, Z. Q., Y. Z. Peng, *et al.* Induction of heat shock protein 70 by sodium arsenite attenuates burn-induced intestinal injury in severe burned rats. Burns, v.34, n.2, Mar, p.247-53. 2008.

Ziegler, T. R., L. G. Ogden, *et al.* Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. Intensive Care Med, v.31, n.8, Aug, p.1079-86. 2005.

Zingarelli, B., M. Sheehan, *et al.* Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. Crit Care Med, v.31, n.1 Suppl, Jan, p.S105-11. 2003.

Zou, N., L. Ao, *et al.* Critical role of extracellular heat shock cognate protein 70 in the myocardial inflammatory response and cardiac dysfunction after global ischemia-reperfusion. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.294, n.6, Jun, p.H2805-13. 2008.

**ANEXO I-Artigo publicado: HSP70 expression- does it a novel fatigue signalling factor
from immune system to the brain?**

HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain?

Thiago Gomes Heck^{1,2,3*}, Cinthia Maria Schöler^{1,2,3} and Paulo I. Homem de Bittencourt^{1,2,3}

¹Laboratory of Cellular Physiology, Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Federal University of Rio Grande do Sul School of Physical Education, Porto Alegre, RS, Brazil

³National Institute of Science and Technology in Hormones and Women's Health (INCT-HSM), Porto Alegre, RS, Brazil

Integrative physiology studies have shown that immune system and central nervous system interplay very closely towards behavioural modulation. Since the 70-kDa heat shock proteins (HSP70s), whose heavy expression during exercise is well documented in the skeletal muscle and other tissues, is also extremely well conserved in nature during all evolutionary periods of species, it is conceivable that HSP70s might participate of physiologic responses such as fatigue induced by some types of physical exercise. In this way, increased circulating levels of extracellular HSP70 (eHSP70) could be envisaged as an immunomodulatory mechanism induced by exercise, besides other chemical messengers (e.g. cytokines) released during an exercise effort, that are able to binding a number of receptors in neural cells. Studies from this laboratory led us to believe that increased levels of eHSP70 in the plasma during exercise and the huge release of eHSP70 from lymphocytes during high-load exercise bouts may participate in the fatigue sensation, also acting as a danger signal from the immune system. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS — HSP70; immune system; exercise; fatigue

INTRODUCTION

Historically, fatigue is an intricate point of human biology.^{1,2} This phenomenon has gained different explanations ranging from the catastrophic theory (also termed peripheral fatigue, i.e. peripherally based, metabolite-induced failure of skeletal muscle contractile function), to central governor theory, in which fatigue would occur only after a summation of different sensory inputs towards the central nervous system (CNS) which 'would decide' how long and how much physical activity should be done without threatening homeostasis.^{2–5}

More recently, an integrative view has been established in which it is apparent that an imperative communication between the CNS and remaining systems must attempt to maintain homeostasis during an exercise demand. In this way, fatigue may be considered a 'conscious' manifestation of subconscious CNS process.⁶

Integrative physiology studies have shown that immune system and CNS have a close relation to behavioural modulation.⁷ This integration occurs by inflammatory and anti-inflammatory mediators acting as signals that can

modify the stress behaviour to prevent damage.⁸ This commentary focuses on the participation of one of the most conserved proteins expressed during the fatigue process: the stress regulated family of 70-kDa heat shock proteins (HSP70s).

Since fatigue is related to a pre-existent stress or to a physiological behaviour that prevents stress during a homeostasis threatening situation, understanding the stress response of HSP70 within immune cells may unravel new avenues for the comprehension of fatigue, its effects and its underlying mechanisms. Indeed, recent studies from our laboratory led us to propose that increased levels of extracellular HSP70 (eHSP70) secreted towards the plasma during physical exercise and the huge release of eHSP70 from lymphocytes during high-load exercise bouts may both participate in the fatigue sensation by the CNS.

HEAT SHOCK PROTEINS

HSPs are highly conserved proteins in both eukaryotic and prokaryotic organisms. The first report about them was documented in salivary gland cells of *Drosophila buskii* after a serendipitous heat shock by Ritossa.^{9–11} Their molecular entities, however, were only characterized later in 1974.^{9–11}

HSPs are categorized in families according to their molecular sizes and include HSP110, HSP100, HSP90,

*Correspondence to: T. G. Heck, Laboratory of Cellular Physiology, Department of Physiology, ICBS, UFRGS, Rua Sarmento Leite, 500—2º andar, lab. 02, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.
E-mail: gomesheck@yahoo.com

HSP70, HSP60, HSP30 and HSP10 subclasses. The most studied (due to its evident high expression in mammalian cells under stress conditions) and conserved is the 70-kDa family (HSP70), which comprises a number of related proteins whose molecular weights range from 66 to 78 kDa. HSP70 isoforms are encoded by a multigene family consisting of, at least, 13 distinct genes in humans so far studied.¹² For the rationalization of the current nomenclature, human HSP70 genes (rat and mouse, also) have given the locus symbol HSPA_x, where A defines members of HSP70 family and X designates the individual loci. In this sense, HSPA8 is the human gene that encodes a 73-kDa constitutive form of HSP70 (HSP73 or HSC70, the cognate form), while HSPA1A gene, located at the major histocompatibility complex (MHC) III region, encodes an inducible form (HSP72 or simply HSP70). In humans, but not in the rat or the mouse, there is an even higher inducible form (HSP70B') encoded by HSPA6 gene. Other representative members, besides mitochondrial (HSP75) and endoplasmic reticulum (HSP78) members of HSP70 family, are found in the intracellular space.¹³

HSP70s are known to function as intracellular molecular chaperones that facilitate protein transport, prevent protein aggregation during folding, and protect newly synthesized polypeptide chains against misfolding and protein denaturation. Molecular chaperone property of such proteins allow them to assist the non-covalent assembly/disassembly of other macromolecular structures without being permanent components of such structures when they are performing their normal biological functions.¹² Additionally, molecular chaperones assist the unfolded protein to achieve its single correct three-dimensional configuration (by whatever mechanism it has evolved to generate this folded state), without becoming a constituent of the final folded protein.¹²

While the constitutive form is expressed in a wide variety of cell types at basal levels (being only moderately inducible), the so-called inducible HSP70 forms (which are barely detectable under non-stressful conditions) could be promptly synthesized under a condition of 'homeostatic stress', this being any 'homeostasis threatening' condition, such as heat, glucose deprivation, lack of growth factors and so forth. Habitually, research groups indistinctly use HSP70 as a unified term for both constitutive and inducible form.¹³⁻¹⁵ However, HSP70 is the preferable form to be used when one refers to the inducible HSP72 protein encoded by HSPA1A gene.

All HSP70 proteins share the same overall structure. They are composed of an actin-like N-terminal nucleotide binding/ATPase domain of 45 kDa, a substrate-binding domain (SBD) of approximately 15 kDa and a C-terminal domain of approximately 10 kDa that is involved in co-chaperone binding.^{16,17} It is of note that N- and C-terminal domains have expressive relevance to antigen presentation, an important way by which HSP70s participate in immune responses.¹⁸

Many different events can induce HSP expression, among them are environmental, pathological and physiological factors, such as heavy metal exposure, UV radiation, amino

acids analogous, bacterial or viral infection, inflammation, cyclo-oxygenase inhibitors (including acetylsalicylic acid), oxidative stress, cytostatic drugs, growth factors, cell differentiation and tissue development, as reviewed early.¹⁹

The functions of HSP70s (both inducible and constitutive forms) are regulated by ATP hydrolysis. The chaperon activity (cycles of binding and release of native proteins during refolding process) depends on the ATP-binding state. While binding to ATP, HSP70s couple with low affinity to its substrates, but in the ADP-bound state, HSP70s bind with higher affinity to them and the ATPase activity of HSP70s is inherently weak. Cooperatively, HSP40 (a 40 kDa family of HSPs) catalyzes this reaction working as a nucleotide exchange factor, because it facilitates the ADP release. Other HSP70-interacting proteins have also been demonstrated.²⁰

INTRACELLULAR FUNCTION OF HSP70

Initially, HSP70s have been described essentially in studies that addressed molecular chaperone action of such proteins, or HSP70s were shown to limit protein aggregation, facilitating protein refolding and maintaining structural function of proteins.¹¹ Intracellular HSP70s have further been demonstrated to be anti-inflammatory (for review, see Ref.²¹), providing cytoprotection through anti-apoptotic mechanisms, inhibiting gene expression and regulating cell-cycle progression.²²

Besides the now classical molecular chaperone action, the most remarkable intracellular effect of HSP70 is the inhibition of nuclear factor κ B (NF- κ B) activation, which has profound implications for immunity, inflammation, cell survival and apoptosis. Indeed, HSP70 blocks NF- κ B activation at different levels. For instance, HSP70 inhibits the phosphorylation of inhibitor of κ B (I κ Bs), while heat-induced HSP70 protein molecules are able to directly bind to I κ B kinase gamma (IKK γ) thus inhibiting tumour necrosis factor- α (TNF α)-induced apoptosis.²³ In fact, the supposition that HSP70 might act intracellularly as a suppressor of NF- κ B pathways has been raised after a number of discoveries in which HSP70 was intentionally induced, such as the inhibition of TNF α -induced activation of phospholipase A₂ in WEHI-S murine fibrosarcoma cells,²⁴ the suppression of astroglial inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS, encoded by NOS-2 gene) expression paralleled by decreased NF- κ B activation²⁵ and the protection of rat hepatocytes from TNF α -induced apoptosis by treating cells with the nitric oxide (NO)-donor SNAP, which reacts with intracellular glutathione molecules generating S-nitrosoglutathione (SNOG) that induces HSP70, and, consequently, HSP70 expression.²⁶

HSP70 confers protection against sepsis-related circulatory fatality via the inhibition of iNOS (NOS-2) gene expression in the rostral ventrolateral medulla through the prevention of NF- κ B activation, inhibition of I κ B kinase activation and consequent inhibition of I κ B degradation.²⁷ This is corroborated by the finding that HSP72 assembles with liver NF- κ B/I κ B complex in the cytosol thus impeding

further transcription of NF- κ B-dependent *TNF- α* and *NOS-2* genes that worsen sepsis in rats.²⁸ This may also be unequivocally demonstrated by treating cells or tissues with HSP70 antisense oligonucleotides that completely reverses the beneficial NF- κ B-inhibiting effect of heat shock and inducible HSP70 expression (see, for instance, Refs.^{26,27}). Hence, HSP70 is anti-inflammatory *per se*, when intracellularly located, which also explains why cyclopentenone prostaglandins (cp-PGs) are powerful anti-inflammatory autacoids.^{29–31}

Another striking effect of HSP70 is the inhibition of apoptosis. Caspases form an apoptotic cascade by an intrinsic pathway characterized by the release of mitochondrial pro-apoptotic factors into the cytosol, while stimulation of cell surface receptors triggers the extrinsic pathway by external signalling factors that may induce the apoptotic process. The inhibitory potential of HSP70 over apoptosis occurs via many intracellular downstream pathways (e.g. JNK, NF- κ B and Akt), which are both directly and indirectly blocked by HSP70 either, besides the inhibition of Bcl-2 release from mitochondria. Together, these mechanisms are responsible for HSP70 anti-apoptotic function in cells under stress conditions.³¹

In conclusion, intracellularly activated HSP70 are cytoprotective and anti-inflammatory by avoiding protein denaturation and excessive NF- κ B activation which may be damaging to the cells.

EXTRACELLULAR FUNCTION OF HSP70

After HSP70s had been found in the circulation, researchers have commenced to study the correlation between HSP70 blood levels and the prognosis in patients suffering from several diseases, usually related to oxidative stress. While healthy people usually have low plasma levels of HSP70, the association of increased blood concentrations of such proteins with illness and disease progression has been hypothesized; contrarily, longevity and health have been attributed to low levels of plasma HSP70.³² In this way, oxidative stress, inflammation, cardiovascular disorders and pulmonary fibrosis have been directly correlated with HSP70 concentration in the bloodstream.³³ On the other hand, glutamine supplementation, which rises circulating HSP70 levels in critically ill patients, is associated with lower hospital treatment period.³⁴ Therefore, these studies may suggest that elevation of HSP70 levels could be an important immunoinflammatory response against physiological disorders or disease.

Since HSP70s exist in the extracellular space, molecular interactions with cell surface receptors may occur and signalling pathways could be triggered in many cell types, whereas there are a variety of receptors to HSP70 binding, amplifying the possible targets to these extracellular molecules.^{35,36} However, the function of circulating HSP70 is incompletely understood yet. HSP70s are released towards the extracellular space by special mechanisms that include pumping across cell membranes through the highly conserved ABC cassette transport proteins. Recent studies

have demonstrated that exosomes provide the major pathway for the vesicular secretory release of HSP70s and that heat stress strikingly enhances the amount of HSP70 secreted *per vesicle*, but does not influence the efficiency of stress-induced rate of HSP70 release and the number of exosomes neither.^{37–39} A similar profile was observed in our hands (T.G. Heck and P.I. Homem de Bittencourt, manuscript in preparation), in which lymph node lymphocytes from exercised rats submitted to a further (other than the exercise bouts) challenge (heat shock) presented an HSP70 accumulation into the culture medium that is dependent on previous exercise load. Apparently, systemic eHSP70 could arise from many tissues and different cell types and this may involve distinct mechanisms of release (including necrosis) and a large variety of inducing factors.⁴⁰ Finally, HSP72 is clearly the major component of the secreted eHSP70 found in the circulation, although recent evidence suggests that other forms may also be released into the blood, as recently pointed out by De Maio.⁴¹ eHSP70 has been shown to bind to type 2 and 4 toll-like receptors (TLR2 and TLR4) on the surface of antigen-presenting cells (APCs) similarly to lipopolysaccharides (LPS), inducing the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α , as well as NO (a product with prominent anti-microbial activity), in an NF- κ B-dependent fashion.^{42–45} Interestingly, however, the component of *Salmonella typhimurium* responsible for the aggregation of the bacterium to the colonic mucus has been found to be a 66-kDa protein which is correlated with the severity of the disease, while monoclonal antibodies anti-HSP65 of *Mycobacterium leprae*, as well as a polyclonal antibody against the 66-kDa protein of *S. typhimurium*, may cause dose-dependent inhibition of the aggregation of *S. typhimurium* by crude mucus preparations.⁴⁶ Because of this and other similar findings, HSP70 is considered a virulence factor of different pathogens.⁴⁷ On the contrary, it has been noticed that different *Helicobacter pylori* strains do induce downregulation of HSC70 (*HSP8*), HSP70 (*HSP1A*) and HSF-1, the main HSP70-inducible transcriptional activator in both *in vivo* and *in vitro* models.⁴⁸ Indeed, Aksen *et al.*⁴⁸ have also argued that HSPs may dampen the host's ability to trigger an inflammatory response, reinforcing the idea that, for *H. pylori*, and probably many other bacterial pathogens, inflammation is neither good nor bad, but it is rather a highly regulated and intrinsic part of chronic infection.

HSP70 INDUCED BY EXERCISE

Exercise and its inherent physiological alterations induce HSP70 expression in many tissues and cell types, not only in the muscle cells. The breakdown of cell homeostasis produced by modifications in temperature, pH, ion concentrations, oxygen partial pressure, glycogen/glucose availability, and ATP depletion are among the factors that activate HSP70 synthesis during exercise.⁴⁹

Rise in core and muscle temperature during exercise seems an obvious way to induce HSP70. However, while skeletal muscle sustains HSP70 expression in the absence of

heat stimulus, the heart is not able to do the same, thus suggesting that the mechanisms of HSP70 protein synthesis are specifically driven in each tissue,^{50–53} and that augmented temperature is insufficient to elicit HSP70 synthesis during exercise. Moreover, the susceptibility of tissues to be stressed by the environmental changes elicited by exercise varies enormously and other protective pathways may be activated in the heart, as we have shown for MRP/GS-X pump ATPases whose expression seems to prevent HSP70 expression in the heart after exercise bouts.⁵⁴

In spite of free radicals may be produced under normal conditions, a burst in reactive oxygen species does occur during exercise.⁵⁵ Besides enzymatic and non-enzymatic antioxidant apparatus, studies in both animal models and humans implicate HSP70s as a complementary protection against oxidative damage,^{56–58} particularly because HSP70s may recover oxidatively denatured proteins.

After an acute exercise session, skeletal muscle,⁵⁹ cardiac muscle⁶⁰ and other tissues, such as the liver,^{61,62} have shown a state of oxidative stress, concomitantly to high concentrations of intracellular HSP70.⁶³ Even though oxidative stress is a strong factor to induce HSP70s in response to exercise, free radical production is not the only pathway involved in this process, since sexual hormones and adrenergic stimuli may modulate HSP70 response^{64–67} and circulating monocytes from acutely exercised rats do not show appreciable changes in erythrocyte GSSG to GSH ratio and plasma TBARS, even in a state of high-profile synthesis of hydrogen peroxide.⁶⁸

More recently, however, it has been demonstrated the presence of HSP70s in the circulation in response to exercise.⁶⁹ Since exercise is able to induce high concentrations of HSP70s in both muscle and plasma, the most obvious hypothesis was, primarily, that skeletal muscle should be the releaser of HSP70 during exercise. However, further studies have revealed that this is not the case, at all. Postural muscles express high levels of HSP70s under basal conditions, which has led to the belief in a preventive role for these proteins against muscle damage through the stabilization of ionic channels,⁷⁰ as well as myotube development.⁷¹ HSP70s were also believed to be an important way to preserve low twitch (oxidative) muscle phenotype after frequent activation, as in physical training.^{72,73} Preservation of intracellular muscular function during different exercises, venous-arterial HSP70 differences in different territories,⁷⁴ and the lack of evidence supporting the proposition that the muscle could be the major source of circulatory eHSP70 precluded the 'muscle hypothesis' and suggested that other tissues/cells should be responsible for the increase of eHSP70 in the circulation. Once HSP70 protein release from muscle to extracellular fluid could eventually happen by lysis process, and considering that the lysis of muscle fibre occurs only under severe cellular stress condition, the presence of eHSP70 during moderate exercise was found to be unfeasible. Though it had been shown that both the intensity and duration of exercise have effects in plasma⁷⁵ and muscle⁷⁶ HSP70 concentration, this rise in circulating levels of HSP70 precedes, however, any gene or protein

expression of HSP70 in skeletal muscle,⁷⁷ which is another strong argument against the 'muscle hypothesis'.

As stated above, other tissues synthesize HSP70s during physiological challenges to the homeostasis, as in an acute physical exercise bout. In this way, after treadmill exercise protocol, the rat liver has been found to enhance the expression of HSP70s.⁶¹ Moreover, and finally, human study featuring leg and hepatosplanchnic venous-arterial HSP70 difference in response to exercise has unequivocally demonstrated that the contracting muscle *does not* contribute to HSP70 circulating levels, while hepatosplanchnic viscera release eHSP70 from undetectable levels at rest to 5.2 pg min⁻¹ after 120 min of exercise.⁷⁴ Additional studies have shown that oral glucose administration may exclusively reduce HSP70 release from the liver without any effect on muscle glycogen content or intracellular expression of HSP70.⁷⁸ Taken together, these results suggest that other cells may release eHSP70 during exercise, as verified during an experiment that analyzed cerebral venous-arterial HSP70 difference.⁷⁹ Although the liver seems to participate in this process, the nature of eHSP70-releasing cell during exercise remains to be established.

HSP70 AND IMMUNE SYSTEM

Although immune system cells (mainly lymphocytes and macrophages) are able to synthesize and release HSP70, there is yet no evidence about the participation of these cells in maintaining HSP70 circulatory levels during exercise. As discussed above for other cell types, besides chaperone-like functions, HSP70s present a dual effect on leukocytes depending on its cellular location, being anti-inflammatory when intracellular and pro-inflammatory when acting extracellularly. Indeed, immune cells are extremely susceptible to HSP70 inducers (for review, see Ref.⁸⁰), so that HSP70 may be considered a target molecule for treating immune-related diseases. Moreover, strong HSP70 inducers, such as electrophilic cp-PGs dramatically inhibit viral replication (including HIV-1) in a way that completely depends on HSP70 synthesis for the entire suppression of viral life cycle.⁸¹ Anti-viral properties of intracellular HSP70 are in association with the modification of viral protein synthesis and inhibition of viral fusion and maturation. As HSP70 synthesis precedes viral protein synthesis, HSP70 expression is not a response induced by denatured viral protein accumulation, as one might expect once HSP70s have chaperone activity. In this way, suppression of HSP70 synthesis abolishes the anti-viral features of cp-PGs.⁸² Anti-viral cp-PG activity is, indeed, mediated by HSP70s through the inhibition of NF- κ B translocation, which is essential for HIV-1 replication.^{83,84} The equilibrium of NF- κ B translocation between virus and host cell can also be a target of intracellular immune effects of HSP70.^{82,85}

The secretion of exosomes with high amounts of HSP70s by peripheral blood mononuclear cells occurs in response to heat shock whereas lymphocytes of T and B types, macrophages and platelets are able to secrete exosomes as

well.^{40,84} The increase in eHSP70 during the exposure to stresses has also been demonstrated to be the result of the activation of the sympathetic nervous system via alpha-adrenergic receptors leading to eHSP70 export and increased eHSP70 serum concentration.⁵⁸ Thus, even though the necrotic cell death might result in the appearance of HSP70 within the extracellular milieu, an increasing number of studies suggest that this is not the major rule but, on the contrary, physiological effectors (e.g. fever, hypoglycemia and sympathetic stimulation) are the true excitatory signals for the eHSP70 exocytotic pathway. Specifically, it has been suggested that lymphocytes are the major releasers among mononuclear cells, being responsible for nearly 100% of total eHSP70 release from immune system cells. It is of note that, although cell death may bring about the delivery of the cytosolic protein content to the plasma, the liberation of eHSP70 from lymphocytes towards the extracellular space is not associated with cell damage process. In fact, in experiments in which eHSP70 release by peripheral mononuclear cells was evaluated, the cell death counts registered have been shown to be of *ca.* 0.1% only.¹¹ Corroborating these data, a study in Jurkat cells has shown that lymphocytes synthesize and release HSP70 in a larger scale than monocytes/macrophages without any vestige of cell death.⁸⁰

There is a growing body of evidence indicating that proteins of the complexes of toll-like receptor (TLR, belonging to the superfamily of the interleukin-1/toll-like) TLR2 and/or TLR4 act as cellular surface receptors to eHSP70, which 'informs' an inflammatory signal to cells of the innate immune response (macrophage/dendritic cells/neutrophils). Under stimulation of TLRs, eHSP70 signalizes cells of the innate immune response by increasing the expression of the protein of first response of myeloid differentiation inflammatory 88/kinase, which is associated to IL-1 receptor/over signal transduction of NF- κ B. Asea and co-workers, have shown that eHSP70 induces NF- κ B activation and the production of inflammatory cytokines in a process that requires CD14, in addition to TLR2 and TLR4. This has led to the concept that CD14 could work as a co-receptor to eHSP70.^{44,86} Interestingly the binding of TLR2 and/or TLR4 selective receptor agonists (Pam3Cys that binds TLR2, or taxol that binds TLR4) to CD14 results in synergic increase of NF- κ B activation,⁴³ thus suggesting that the release of eHSP70 into the blood after exposure to stressor agents (e.g. exercise, and even psychological stressing situations) could result in disseminated inflammation.⁸⁷

eHSP70 stimulates the proliferation of TCD4⁺ lymphocytes and changes their phenotype to a more cytotoxic one, since the mediators found in inflammation IL-6 and IL-8 are produced in response to eHSP70. On the other hand, TCD8⁺ lymphocyte properties are not affected significantly. However, eHSP70 binding to TCD3⁺ lymphocytes, via TLR2 receptors, can result in adaptive and innate immune response activation, specifically assisting CD8⁺ lymphocyte cytotoxic activity and promoting the proliferation of natural killer (NK) cells.¹¹ Circulatory eHSP70 can produce cellular

effects by binding to cell surface receptors in APCs, via the interaction with TLR2, TLR4, CD40, CD91, CD14, CCR5 receptors and scavenger receptors LOX-1 and SREC-1. Nevertheless, few information does exist about HSP70 receptors in lymphocytes, in active or inactive states.^{35,39,88}

HSP70s bind to several macrophage surface receptors and regulate specific and non-specific key functions of antigens, including cytokine release, phagocytosis, tumour rejection and upregulation of co-stimulatory molecules.^{36,45,89-94} HSP70s are also intimately implicated in innate immune response, as many, if not all, class I MHC proteins present HSP ligands for immune inspection.⁹⁵

Since HSPs are a sort of proteins extremely well conserved in nature during the evolution of all species, one can, teleologically, suppose that HSPs shall participate in many primitive physiologic responses of the organisms. The cytoprotection given by the production of intracellular HSP72 in response to the thermal stress is a good example.⁹⁶ The link of eHSP70 with receptors that are highly preserved during the evolution, such as TLRs, offers another clue in that these proteins, beyond its role as molecular chaperones, may participate as a danger signal from the immune system to the whole body. It has also been hypothesized that the ability of leukocytes to express HSP72s could be an indicative of a good prognosis in different conditions. For instance, it has been shown that maintaining physical activity during aging can preserve the ability of leukocytes to induce HSP72 in response to physiological stress, this being associated with good health parameters.⁸¹

EXTRACELLULAR HSP70 AND IMMUNE FUNCTION DURING PHYSICAL EXERCISE

The role of eHSP70s in immune responses^{18,97,98} has been studied in several homeostasis threatening conditions apart from exercise.^{69,74,78,80} Many, if not all of them suggest that circulating eHSP70 could be an immunomodulatory mechanism induced by exercise, being of primordial relevance for the comprehension of the origin of such a protein, as well as the immune cell responses during higher eHSP70 plasmatic levels during exercise.

At rest, thereabout 50% of immune cells are found in the bloodstream, while another half is adhered to the vascular wall. At the start of an exercise effort, the majority of immune cells unfix from the endothelium by sympathetic activation. Concomitantly, noradrenaline induces an increase in eHSP70 levels by the interaction with α -adrenergic receptor.⁷⁵ Neutrophil, lymphocyte and NK cell numbers can increase, two-, four- and ninefold, respectively, during exercise when compared with rest values, and these modifications are dependent on exercise intensity. In trained subjects, where cortisol levels during moderate exercise are lower than in untrained ones, the mild stress (due to exercise) to the immune system does not result in great leukocytosis. On the other hand, during the recovery phase from exercise, a decrease in NK cell number occurs in the bloodstream. Similar effects are shown by lymphocyte during first 48 h after exercise. In mononuclear cells, HSP70

expression was significantly increased immediately after the ultra-marathon, remaining at high levels 2 h post-exercise, returning to rest (low) levels 24 h after the trial.¹¹ This reduction could be attributed to hormonal response, which can produce 'homing' effects, in other words, the permanence of high amount of immune cells inside the organs and lymph nodes, which worsens the defense of the organism against infection. Concomitantly, in the early phase after high-intensity exercise, eHSP70 is elevated in peripheral blood. Afterwards, eHSP70 blood concentration returns to the lower basal levels as soon as 2 h after the end of the physical effort, remaining practically undetectable for 24 h.^{11,99} This high susceptible period is named 'open window', when airway infections are facilitated, which is the second reason for training interruption in elite athletes.

Moderate-intensity exercise when regularly practiced, on the other hand, may improve immune defense by an increase in macrophage activity¹⁰⁰ and lymphocyte stimulation. In animals infected with herpes virus, moderate exercise decreases mortality and morbidity rates, while strenuous exercise has the opposite effect.⁶⁸ Although CD4⁺ lymphocyte (and also other immune cells) number increases during both intense and moderate exercise, the downfall of immune defenses during the 'open window' period (which can last for 3–72 h after exercise) occurs only following high-intensity physical activity.¹⁰¹ Interestingly, exercise is able to increase lymphocyte proliferation and cytokine production, while increasing vaccine efficacy in experimental models.¹⁰² The spread effect of exercise is found in other immune system cells, as observed during the stimulatory effect on macrophage phagocytosis.¹⁰³ The HSP70 stimulating effect over monocytes/macrophages leads to the expression of the NOS-2, thus promoting NO production,¹⁰⁴ which is microbicidal. In addition to TNF- α production, NO production has been shown to be the principal tumoricidal mechanism of activated macrophages both *in vitro* and *in vivo*.⁶⁸ Phagocytosis is also increased in macrophages treated with HSP70 *in vitro*.¹⁰⁵ On the other hand, results from our laboratory have shown an increase of phagocytosis by macrophages from rats submitted to the 'stress' of moderate physical exercise.⁸⁹ These considerations and the fact that moderate loads of exercise do increase intracellular HSP70s in lymphocytes, whereas higher loads increase eHSP70 release from these cells, as stated above, suggest that eHSP70 may also function as an actual immune signal to target organs and this may be a physiological universal during exercise efforts.

MOLECULAR BASES OF FATIGUE WITHIN THE CNS

Physical exercise is recommended for the treatment of many chronic metabolic diseases or simply to 'release stress', with many types of exercises. Despite over 100 years of scientific inquiry into the mechanisms of muscle fatigue, many issues remain unclear, particularly because of the initial definitions: 'fatigue is the failure to maintain the required force or power for the task'. Typically, this is a focus of

researchers who perform isolated experiments, in muscle motor units, for example. However, there are considerable biochemical and physiological levels of cross-regulation and integration between central and peripheral organs. Since fatigue was perceived also as a physiological process that occurs within CNS, many factors were included in the above *a priori* simplistic definition to allow the understanding of fatigue during exercise, such as motivation, central command failure and motor unit behaviour.^{68,106}

Gradual brain cortical activity is present during fatiguing contractions, when the increase of central drive to the fatiguing muscles results in the spread of cortical activation to promote some help to neighbour muscles in which depletion of acetylcholine within motor end plate is found. Furthermore, the CNS has the ability of roaming the activity of the motor neurons by changes in the recruitment order and discharge rate during submaximal contractions. Hypoxemia, hypotension and hyperthermia, are all rare situations that may also contribute to the sensation of fatigue, besides a possible failure in the function of sarcolemmal transverse tubules at the neuromuscular junction.^{106,107}

The interpretation of CNS participation during fatiguing process has many experimental biases: the type of muscle contraction required (concentric and eccentric contractions have different neuronal modulation),¹⁰⁷ the intensity of task (maximal or submaximal exercise) and duration of activity are some of them which are present in many fatigue studies. Thence, the multifactorial phenomenon named as fatigue, not necessarily involves all individual process of muscle failure, metabolic deviations from the homeostatic points or CNS processes^{106,108} in order to the exercise be terminated by the fatigue sensation. Isolated control of fatigue, as previously argued, makes little sense from an evolutionary perspective. It is not correlated with the 'flight-or-fight' principle that governs vertebrate physiology. An integrative process is much more plausible to explain body control over a vast majority of physical demands.

Central factors may have important roles to promote exercise termination. In this sense, 'motivation' is an essential factor to improve performance during an exercise test. If the subject is not 'motivated', this will cause a premature termination of muscle contraction and the companion sensation of 'muscle fatigue'. Some conditions can modify the motivation, such as pain and discomfort, but it could also be modified by the exercise situation (recreational or competitive) and could be modulated by variation in the levels of neuromodulator, such as epinephrine and serotonin (5-HT). Evidence suggests a role of neurotransmitters, hormones and amino acids in regulating fatigue during an exercise session.^{107,109–112} An increase in brain concentrations of 5-HT can be observed during physical exercise and repetition of this stimulus (training) leads to an adaptation or desensitization of central 5-HT_{1A} serotonin receptors (5-HT_{1A}), which influence physical performance and the well-being in general, thus promoting higher exercise tolerance.^{109,110,113} These observations suggest that exercise may promote the modification of gene transcription as well.¹¹² Accordingly, 5-HT in the

brain is also affected by exercise and modifies the expression of pre-synaptic receptors and 5-HT auto-receptors. While moderate physical exercise does not affect free L-tryptophan metabolism (which is presented itself at high concentrations in an exercise situation), some adaptations on the blood brain barrier occurs.^{111,114,115} Angiotensin II appears to assist in the delay for the establishment of central fatigue by promoting heat dissipation, decreasing heart rate and lowering brain temperature during physical stress. Several works point out that the activation of AT1 angiotensin receptor is involved in thermoregulation and postponement of central fatigue by promoting a significant brain protection against thermal damage,^{112,116} thus allowing the individual to proceed with the physical demand. However, conflicting studies have shown no significant differences on sports performance at low 5-HT levels.¹¹⁷ Inhibition of norepinephrine uptake (i.e. a more pronounced noradrenergic effect) was shown to significantly increase the time elapsed before the establishment of a drop in exercise performances under normal-temperature environments and heat as well, although there is also evidence suggesting that catecholamines may not affect the income of the fatigue status.¹¹⁸

Physical exercise has many effects on the CNS, much more than mood influence. Peripheral signals generated during and after an exercise session, such as IL-6 and IL-10, decrease endoplasmic reticulum stress markers at hypothalamic level, an effect related to the decrease in NF- κ B activation,¹¹⁹ similarly to that observed by intracellular HSP70 expression. Additionally, an association between increased NF- κ B gene expression and activation in human leukocytes from cancer patients and a persistent fatigue state has been reported.¹²⁰ Therefore, one cannot exclude the possibility that eHSP70 could be signalling a pro-inflammatory status from the immune system to CNS in order to impose a 'fatigue behaviour'.

As in the case of other cell types, CNS cells present stress inducible heat shock response. In response to fever or fever-like augmentations in body temperature, glial cells show induction of HSP70s while higher constitutive levels of these proteins impose a state of acquired thermotolerance, which is characterized by lower heat-induced expression of HSP70 following a further episode of hyperthermia or ischaemic events.¹²¹ Additionally, some type of neuronal cells, such as motor and sensory neurons, usually show a particularly high threshold for HSP70 induction, which was found to be associated with a failure in the activation of HSF-1.²⁰ It has also been noticed that HSPs may be transferred between cell types in the nervous system. Accordingly, HSP70s synthesized in glial cells may be rapidly transported into adjacent axons as a mechanism of fast delivery of neuroprotective agent. The post-synaptic neuron that 'receives' HSP70 exhibits an enhanced tolerance to stress while the *in vivo* administration of HSP70 results in inhibition of motor and sensory nerve degeneration.¹²² A thermotolerant state is also observed after prior expression of HSP70 in neurons that results in protection of synaptic neurotransmission against damage insults.²⁰ Secretion of HSP70s by CNS cells appears to be mediated by exosomes

formed at lipid rafts, which is reinforced by the finding that the brain is enriched in lipid rafts.²⁰

Although a conspicuous body of evidence indicates that the brain behaves as a major HSP70 releaser to the blood stream, there is yet no study approaching the opposite, that is, that CNS cells may take up HSP70 from the circulation and that this may function as a stress/danger signal from of peripheral cells. This prediction is currently under consideration in our laboratory.

IMMUNE CELL-TO-CNS SIGNALLING NETWORK FOR FATIGUE

The processes of building certain behaviours and control of them can be analyzed under the optics of neuroimmunomodulation. The expression of 'sickness behaviour' can be induced by immune modifications and immune capacities that are associated with distinct behaviour in mammals. Studies on animal models show that 'submissive behaviour' is associated with reduction of oxidative burst and cytotoxicity of NK cells, which are signals of impaired immune function and may represent an increased susceptibility to disease development.^{7,123} In this sense, it is clear the participation of mediators including TNF- α , interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-6, through the inhibition of noradrenalin-induced melatonin production, the activation of hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the impairment of the transcription of enzymes required for neurotransmission.^{7,8} In parallel, research in the physical exercise field has been progressively showing the participation of cytokines during exercise demands. For instance, the release of skeletal muscle-derived IL-6 into the blood is the most remarkable alteration in cytokine pattern observed during exercise so that IL-6 is now considered as an exercise factor, a 'myokine',^{8,124} not just an inflammatory mediator. Additionally, as previously hypothesized,^{125,126} exercise-evoked IL-6 may also act on the CNS to induce the fatigue sensation. Although IL-6 is always produced during the course of an inflammatory response, it has a truly anti-inflammatory action and, when produced during exercise, IL-6 may indeed exert a protective role. In other words, the skeletal muscle must be considered as an auxiliary endocrine organ that interacts with the immune system and CNS, so that IL-6 is a robust exercise marker.

Myokine signals are correlated with sensation of fatigue, and alongside other cytokines, such as IL-1 and TNF- α , myokines have been demonstrated to be inducers of sleep or illness response and pyrogenic behaviour.^{125,127} Also, brain macrophages have been shown to contribute to the increase in brain IL-1 β and the 'fatigue behaviour' that is associated with the recovery from exercise-induced muscle damage,^{127,128} a clear demonstration of cross-talk between immune and 'fatigue sensation systems'. Similarly to the cytokines released by immune cells during exercise, serum HSP70 concentration does rise after exercise sessions, mainly because of the contribution of lymphocytes.¹²⁸ As a corollary, lymphocyte-derived HSP70s may interplay with CNS to induce the state of 'fatigue behaviour'. Con-

sequently, HSP70 (intra or extracellularly located) is also a strong and unbiased exercise marker, especially if compared to circulating levels of IL-6.

Enhanced thermotolerance of larval neuromuscular transmission conferred by heat shock-induced HSP70 overexpression has been observed.¹³⁰ However, the involvement of HSP70 in heat shock-mediated protection remains unclear. On the other hand, HSP70 has been proved to protect CNS against cerebral ischaemic injury and to mitigate neurodegenerative disorders.¹²⁹ Indeed, overall neuronal function is affected prior to hyperthermic cell death while a previous heat shock treatment is able to sustain synaptic performance via pre- and post-synaptic modifications that occur in parallel with HSP70 induction.²⁰ Additionally, incubation of mouse brainstem slices with inducible HSP70 has been found to relieve the effects of thermal stress neural transmission, which indicates that targeting HSP70 to motor neurons is sufficient to induce thermoprotection. However, directing HSP70 to the skeletal muscle results in no difference of performance.^{129,130} Summarizing, motor neurons must be considered the critical neuronal targets for eliciting HSP70-mediated thermoprotection during locomotion (or during the capital flight-or-fight behaviour) whereas peripheral sensory neurons, dopaminergic and serotonergic neurons alone are not sufficient to impose an HSP70-mediated thermoprotective behaviour.^{129,130}

CONCLUDING REMARKS

As summarized in Figure 1, physical exercise promotes stimulation of autonomic nervous system leading the increased catecholamine plasma concentrations which modify redox status in target organs with higher metabolic demands during exercise, such as the liver and skeletal muscle. Contracting muscle and circulating lymphocytes 'see' exercise-evoked rise in vascular shear stress and circulating 'danger signals', such as IL-1, IL-6 and angiotensin II. The oxidative modification of intracellular milieu of such territories induces intracellular HSP70 expression that prevents cell damage and represents an important defense against injury induced by intense metabolism and associated protein denaturation. eHSP70 release by the liver may be a metabolic response to plasma glucose alterations as well as to adrenergic stimulation triggered by physical activity, while lymphocytes may release eHSP70 towards the extracellular space following induction by muscle signals, such as IL-6 and glutamine.

Within lymphocytes, intracellular HSP70 (increased by chronic adaptations to exercise training) plays an anti-inflammatory role, while eHSP70 binding to toll-like receptors (TLR-2/4) represents a pro-inflammatory stimulus that may result in a fatigue signal to the CNS during the higher load bouts of acute or chronic exercise. Indeed, chronic adaptation of HSP70 synthesizing machinery works as a thermotolerant state for the muscle, immune cells and CNS. This may explain why HIV/AIDS patients subjected to exercise training protocols show an evident

'health behaviour'¹³⁰⁻¹³² associated to a rise in immune system function.^{108,133} exercise induces HSP70 expression and the consequent HSP70-dependent blockade of viral NF- κ B activation reduces viral proliferation, while exercise-induced liberation of eHSP70 into the circulation evokes a state of inflammation that stimulate immune system function as a whole.

Besides the above considerations, eHSP70 released from immune cells during exercise, mainly from lymphocytes, fulfil all the features to be an immune signal from the periphery to the CNS, inasmuch as eHSP70 has proven to exert a marked influence on motor neurons and deeper structures of CNS (e.g. hypothalamus) leading to the 'fatigue sensation/behaviour'. In other words, after eHSP70 concentrations had reached a maximum, further exercise load would be dangerous and the immune system signals that to CNS in order to impose fatigue sensation and shutdown of exercise. Moreover, and still most important, the ratio between lymphocyte HSP70 content and lymphocyte-derived eHSP70 blood levels during exercise sessions and along exercise training protocols may represent a novel and unbiased diagnostic tool to impose the limit of the exercise load to immunosuppressed patients in order to maintain their immune function without fatigue.

ABBREVIATIONS

5-HT	5hydroxytryptamine serotonin
5-HT1A	5HT receptor 1A
APC	antigen-presenting cell
CCR5	C-C motif chemokine receptor type 5
CNS	central nervous system
cp-PG	cyclopentenone prostaglandin
GSH	glutathione
GSSG	glutathione disulfide
HIV-1	human immunodeficiency virus-1
HSP70	the 70-kDa family of heat shock proteins
HSC70	heat shock cognate proteins the constitutive forms of HSP70 gene family
eHSP70	extracellular HSP70
HSF-1	heat shock transcription factor-1
IKKs	the inhibitor of nuclear factor (B (I(B) kinases
IL	interleukin
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LOX-1	lectin-type oxidized LDL receptor-1 also known as oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (OLR-1)
LPS	lipopolysaccharides
MHC	major histocompatibility gene complex
MRP/GS-X	the glutathione S-conjugate export ATPases of the multidrug resistance-associated gene family
NF-(B	nuclear factor (B
NK	natural killer lymphocytes
NO	nitric oxide free radical (NO')
NOS	NO synthase
SNOG	S-nitrosoglutathione

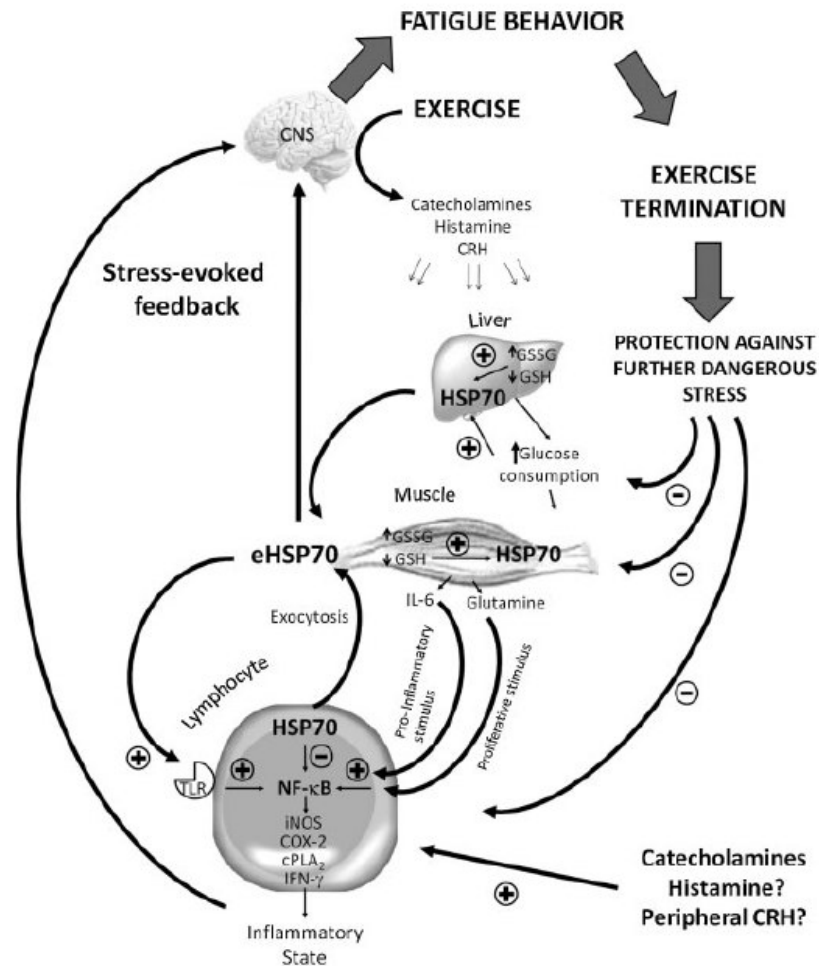


Figure 1. Possible role of HSP70 as a fatigue signal during exercise. Exercise promotes stimulation of autonomic nervous system leading to increased catecholamine plasma concentrations which modify redox status in target organs with higher metabolic demands during exercise, such as the liver and skeletal muscle. Also, peripheral corticotropin-releasing hormone (CRH) and histamine produced at sympathetic post-ganglionic terminals may be involved in lymphocyte stimulation during exercise bouts. The consequent oxidative modification induces intracellular HSP70 expression that prevents tissue damage. HSP70 release by the liver may be a metabolic response to plasma glucose alterations as well as to adrenergic stimulation, while lymphocytes may release HSP70 towards the extracellular space (eHSP70) following induction by muscle signals, such as interleukin-6 (IL-6) and glutamine. Within lymphocytes, intracellular HSP70 (increased by chronic adaptations to exercise training) plays an anti-inflammatory role, while eHSP70 binding to toll-like receptors (TLR-2/4) represents a pro-inflammatory stimulus that may result in a fatigue signal to the CNS during the higher load bouts of acute or chronic exercise. Then, the balance between intracellular HSP70 in lymphocytes and its ability of exporting eHSP70 towards the circulation determines the optimum of exercise-dependent stimulation of immunoinflammatory function before fatigue has been attained.

SREC-1 type F scavenger receptor expressed by endothelial cells
 TBARS thiobarbituric acid-reactive substances
 TLR toll-like receptor
 TNF- α tumour necrosis factor- α

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by grants received from the following Brazilian public funds: CAPES, FAPERGS, FAPESP, MCT/CNPq, MS/DECIT, CT-CIOTEC and CT-

Saúde. T.G.H. and C.M.S. were supported by a fellowship from CAPES-Brasília.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Bassett DR, Jr. Scientific contributions of A.V. Hill: exercise physiology pioneer. *J Appl Physiol* 2002; **93**(5): 1567–1582.

2. Hill A, Lupton H. Muscular exercise lactic acid, and the supply and utilization of oxygen. *Q J Med* 1923; **16**: 135–171.
3. Hill AV. Muscular activity and carbohydrate metabolism. *Science* 1924; **60**(1562): 505–514.
4. Noakes TD, St Clair Gibson A. Logical limitations to the “catastrophe” models of fatigue during exercise in humans. *Br J Sports Med* 2004; **38**(5): 648–649.
5. Noakes TD, St Clair Gibson A, Lambert EV. From catastrophe to complexity: a novel model of integrative central neural regulation of effort and fatigue during exercise in humans: summary and conclusions. *Br J Sports Med* 2005; **39**(2): 120–124.
6. St Clair Gibson A, Baden DA, Lambert MI, et al. The conscious perception of the sensation of fatigue. *Sports Med* 2003; **33**(3): 167–176.
7. Costa-Pinto FA, Cohn DW, Sa-Rocha VM, Sa-Rocha LC, Palermo-Neto J. Behavior: a relevant tool for brain-immune system interaction studies. *Ann NY Acad Sci* 2009; **1153**: 107–119.
8. Couto-Moraes R, Palermo-Neto J, Markus RP. The immune-pineal axis: stress as a modulator of pineal gland function. *Ann NY Acad Sci* 2009; **1153**: 193–202.
9. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 1974; **84**(3): 389–398.
10. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; **18**(12): 571–573.
11. Johnson JD, Fleshner M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol* 2006; **79**(3): 425–434.
12. Henderson B. Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. *Cell Biochem Funct* 2010; **28**(1): 1–14.
13. Tavaría M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. A hitchhiker’s guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1996; **1**(1): 23–28.
14. Arya R, Mallik M, Lakhotia SC. Heat shock genes—integrating cell survival and death. *J Biosci* 2007; **32**(3): 595–610.
15. Tavaría M, Gabriele T, Anderson RL, et al. Localization of the gene encoding the human heat shock cognate protein, HSP73, to chromosome 11. *Genomics* 1995; **29**(1): 266–268.
16. Hu B, Mayer MP, Tomita M. Modeling Hsp70-mediated protein folding. *Biophys J* 2006; **91**(2): 496–507.
17. Erbse A, Mayer MP, Bukau B. Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones. *Biochem Soc Trans* 2004; **32**(Pt 4): 617–621.
18. Asea A. Stress proteins and initiation of immune response: chaperone activity of hsp72. *Exerc Immunol Rev* 2005; **11**: 34–45.
19. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; **22**: 631–677.
20. Calderwood SK (ed.). *Cell Stress Proteins*. Springer: New York, 2007.
21. Gutierrez LL, Maslinkiewicz A, Curi R, Homem de Bittencourt PI, Jr. Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. *Biochem Pharmacol* 2008; **75**(12): 2245–2262.
22. Beere HM. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest* 2005; **115**(10): 2633–2639.
23. Ran R, Lu A, Zhang L, et al. Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. *Genes Dev* 2004; **18**(12): 1466–1481.
24. Jaattela M. Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *J Immunol* 1993; **151**(8): 4286–4294.
25. Feinstein DL, Galea E, Aquino DA, Li GC, Xu H, Reis DJ. Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric-oxide synthase expression by decreasing NFkappaB activation. *J Biol Chem* 1996; **271**(30): 17724–17732.
26. Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 1997; **272**(2): 1402–1411.
27. Chan JY, Ou CC, Wang LL, Chan SH. Heat shock protein 70 confers cardiovascular protection during endotoxemia via inhibition of nuclear factor-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in the rostral ventrolateral medulla. *Circulation* 2004; **110**(23): 3560–3566.
28. Chen HW, Kuo HT, Wang SJ, Lu TS, Yang RC. In vivo heat shock protein assembles with septic liver NF-kappaB/I-kappaB complex regulating NF-kappaB activity. *Shock* 2005; **24**(3): 232–238.
29. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, et al. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* 2000; **403**(6765): 103–108.
30. Homem de Bittencourt PI, Curi R, Jr. Antiproliferative prostaglandins and the MRP/GS-X pump role in cancer immunosuppression and insight into new strategies in cancer gene therapy. *Biochem Pharmacol* 2001; **62**(7): 811–819.
31. Beere HM. “The stress of dying”: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 2004; **117**(Pt 13): 2641–2651.
32. Terry DF, McCormick M, Andersen S, et al. Cardiovascular disease delay in centenarian offspring: role of heat shock proteins. *Ann NY Acad Sci* 2004; **1019**: 502–505.
33. Ogawa F, Shimizu K, Hara T, et al. Serum levels of heat shock protein 70, a biomarker of cellular stress, are elevated in patients with systemic sclerosis: association with fibrosis and vascular damage. *Clin Exp Rheumatol* 2008; **26**(4): 659–662.
34. Ziegler TR, Ogden LG, Singleton KD, et al. Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2005; **31**(8): 1079–1086.
35. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ, Jr., Theriault JR. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett* 2007; **581**(19): 3689–3694.
36. Calderwood SK, Theriault J, Gray PJ, Gong J. Cell surface receptors for molecular chaperones. *Methods* 2007; **43**(3): 199–206.
37. Sun Y, MacRae TH. The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS J* 2005; **272**(11): 2613–2627.
38. Lancaster GI, Febbraio MA. Exosome-dependent trafficking of HS P70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem* 2005; **280**(24): 23349–23355.
39. Multhoff G. Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods* 2007; **43**(3): 229–237.
40. Mambula SS, Stevenson MA, Ogawa K, Calderwood SK. Mechanisms for Hsp70 secretion: crossing membranes without a leader. *Methods* 2007; **43**(3): 168–175.
41. De Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the stress observation system: a form of communication during injury, infection, and cell damage: it is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones*. Epub ahead of print, DOI: 10.1007/s12192-010-0236-4.
42. Ao L, Zou N, Cleveland JC, Jr., Fullerton DA, Meng X. Myocardial TLR4 is a determinant of neutrophil infiltration after global myocardial ischemia: mediating KC and MCP-1 expression induced by extracellular HSC70. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; **297**(1): H21–H28.
43. Asea A. Chaperone-induced signal transduction pathways. *Exerc Immunol Rev* 2003; **9**: 25–33.
44. Asea A. Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2008; (183): 111–127.
45. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**(17): 15107–15112.
46. Engraber M, Loos M. A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect Immun* 1992; **60**(8): 3072–3078.
47. Lathigra RB, Butcher PD, Garbe TR, Young DB. Heat shock proteins as virulence factors of pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991; **167**: 125–143.
48. Axsen WS, Styer CM, Solnick JV. Inhibition of heat shock protein expression by *Helicobacter pylori*. *Microb Pathog* 2009; **47**(4): 231–236.

49. Noble EG, Milne KJ, Melling CW. Heat shock proteins and exercise: a primer. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008; **33**(5): 1050–1065.
50. Harris MB, Starnes JW. Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; **280**(5): H2271–H2280.
51. Skidmore R, Gutierrez JA, Guerriero V, Jr., Kregel KC. HSP70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. *Am J Physiol* 1995; **268**(1 Pt 2): R92–R97.
52. Morton JP, Maclaren DP, Cable NT, et al. Elevated core and muscle temperature to levels comparable to exercise do not increase heat shock protein content of skeletal muscle of physically active men. *Acta Physiol (Oxf)* 2007; **190**(4): 319–327.
53. Staib JL, Quindry JC, French JP, Criswell DS, Powers SK. Increased temperature, not cardiac load, activates heat shock transcription factor 1 and heat shock protein 72 expression in the heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; **292**(1): R432–R439.
54. Krause MS, Oliveira LP, Jr., Silveira EM, et al. MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells? *Cell Biochem Funct* 2007; **25**(1): 23–32.
55. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* 2009; **8**: 1.
56. Smolka MB, Zoppi CC, Alves AA, et al. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; **279**(5): R1539–R1545.
57. Simar D, Malatesta D, Badiou S, Dupuy AM, Caillaud C. Physical activity modulates heat shock protein-72 expression and limits oxidative damage accumulation in a healthy elderly population aged 60–90 years. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; **62**(12): 1413–1419.
58. Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL, Powers SK. Exercise, antioxidants, and HS P72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2003; **34**(7): 800–809.
59. Hernandez R, Manso R. Muscle fibre stress in response to exercise: synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. *Eur J Biochem* 1997; **243**(1–2): 460–467.
60. Locke M, Noble EG, Tanguay RM, Feild MR, Ianuzzo SE, Ianuzzo CD. Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am J Physiol* 1995; **268** (6 Pt 1): C1387–C1394.
61. Gonzalez B, Manso R. Induction, modification and accumulation of HSP70s in the rat liver after acute exercise: early and late responses. *J Physiol* 2004; **556**(Pt 2): 369–385.
62. Kregel KC, Moseley PL. Differential effects of exercise and heat stress on liver HSP70 accumulation with aging. *J Appl Physiol* 1996; **80**(2): 547–551.
63. Salo DC, Donovan CM, Davies KJ. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic Biol Med* 1991; **11**(3): 239–246.
64. Paroo Z, Noble EG. Isoproterenol potentiates exercise-induction of Hsp70 in cardiac and skeletal muscle. *Cell Stress Chaperones* 1999; **4**(3): 199–204.
65. Paroo Z, Dipchand ES, Noble EG. Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **282**(2): C245–C251.
66. Paroo Z, Haist JV, Karmazyn M, Noble EG. Exercise improves postischemic cardiac function in males but not females: consequences of a novel sex-specific heat shock protein 70 response. *Circ Res* 2002; **90**(8): 911–917.
67. Paroo Z, Tiidus PM, Noble EG. Estrogen attenuates HSP 72 expression in acutely exercised male rodents. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1999; **80**(3): 180–184.
68. Silveira EM, Rodrigues MF, Krause MS, et al. Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF-kappaB pathways. *Cell Biochem Funct* 2007; **25**(1): 63–73.
69. Walsh RC, Koukoulas I, Garnham A, Moseley PL, Hargreaves M, Febbraio MA. Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell Stress Chaperones* 2001; **6**(4): 386–393.
70. Tupling AR, Bombardier E, Stewart RD, Vigna C, Aquil AE. Muscle fiber type-specific response of Hsp70 expression in human quadriceps following acute isometric exercise. *J Appl Physiol* 2007; **103**(6): 2105–2111.
71. Kayani AC, Close GL, Broome CS, Jackson MJ, McArdle A. Enhanced recovery from contraction-induced damage in skeletal muscles of old mice following treatment with the heat shock protein inducer 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin. *Rejuvenation Res* 2008; **11**(6): 1021–1030.
72. Kelly DA, Tiidus PM, Houston ME, Noble EG. Effect of vitamin E deprivation and exercise training on induction of HSP70. *J Appl Physiol* 1996; **81**(6): 2379–2385.
73. Murlasits Z, Cutlip RG, Geronilla KB, Rao KM, Wonderlin WF, Alway SE. Resistance training increases heat shock protein levels in skeletal muscle of young and old rats. *Exp Gerontol* 2006; **41**(4): 398–406.
74. Febbraio MA, Ott P, Nielsen HB, et al. Exercise induces hepatoplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. *J Physiol* 2002; **544**(Pt 3): 957–962.
75. Fehrenbach E, Niess AM, Voelker K, Northoff H, Mooren FC. Exercise intensity and duration affect blood soluble HSP72. *Int J Sports Med* 2005; **26**(7): 552–557.
76. Milne KJ, Noble EG. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *J Appl Physiol* 2002; **93**(2): 561–568.
77. Febbraio MA, Steensberg A, Walsh R, et al. Reduced glycogen availability is associated with an elevation in HSP72 in contracting human skeletal muscle. *J Physiol* 2002; **538**(Pt 3): 911–917.
78. Febbraio MA, Mesa JL, Chung J, et al. Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans. *Cell Stress Chaperones* 2004; **9**(4): 390–396.
79. Lancaster GI, Moller K, Nielsen B, Secher NH, Febbraio MA, Nybo L. Exercise induces the release of heat shock protein 72 from the human brain in vivo. *Cell Stress Chaperones* 2004; **9**(3): 276–280.
80. Hunter-Lavin C, Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Andrew SM, Williams JH. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **324**(2): 511–517.
81. Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol* 1998; **16**(9): 833–838.
82. Santoro MG. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* 2000; **59**(1): 55–63.
83. Amici C, Santoro MG. Suppression of virus replication by prostaglandin A is associated with heat shock protein synthesis. *J Gen Virol* 1991; **72**(Pt 8): 1877–1885.
84. Amici C, Giorgi C, Rossi A, Santoro MG. Selective inhibition of virus protein synthesis by prostaglandin A1: a translational block associated with HSP70 synthesis. *J Virol* 1994; **68**(11): 6890–6899.
85. Santoro MG, Rossi A, Amici C. NF-kappaB and virus infection: who controls whom. *EMBO J* 2003; **22**(11): 2552–2560.
86. Ireland HE, Leoni F, Altaie O, et al. Measuring the secretion of heat shock proteins from cells. *Methods* 2007; **43**(3): 176–183.
87. Asea A, Rehli M, Kabingu E, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HS P70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002; **277**(17): 15028–15034.
88. Figueiredo C, Wittmann M, Wang D, et al. Heat shock protein 70 (HSP70) induces cytotoxicity of T-helper cells. *Blood* 2008; **113**(13): 3008–3016.
89. Kovalchin JT, Wang R, Wagh MS, Azoulay J, Sanders M, Chandawarkar RY. In vivo delivery of heat shock protein 70 accelerates wound healing by up-regulating macrophage-mediated phagocytosis. *Wound Repair Regen* 2006; **14**(2): 129–137.
90. Binder RJ, Harris ML, Menoret A, Srivastava PK. Saturation, competition, and specificity in interaction of heat shock proteins (hsp) gp96, hsp90, and hsp70 with CD11b+ cells. *J Immunol* 2000; **165**(5): 2582–2587.
91. Delneste Y, Charbonnier P, Herbault N, et al. Interferon-gamma switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages. *Blood* 2003; **101**(1): 143–150.
92. Berwin B, Hart JP, Rice S, et al. Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *EMBO J* 2003; **22**(22): 6127–6136.

93. Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, *et al.* The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**(23): 20847–20853.
94. Radsak MP, Hilf N, Singh-Jasuja H, *et al.* The heat shock protein Gp96 binds to human neutrophils and monocytes and stimulates effector functions. *Blood* 2003; **101**(7): 2810–2815.
95. Basu N, Nakano T, Grau EG, Iwama GK. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *Gen Comp Endocrinol* 2001; **124**(1): 97–105.
96. Hickman-Miller HD, Hildebrand WH. The immune response under stress: the role of HSP-derived peptides. *Trends Immunol* 2004; **25**(8): 427–433.
97. Simar D, Malatesta D, Koechlin C, Cristol JP, Vendrell JP, Caillaud C. Effect of age on Hsp72 expression in leukocytes of healthy active people. *Exp Gerontol* 2004; **39**(10): 1467–1474.
98. Asea A. Initiation of the immune response by extracellular Hsp72: chaperone activity of Hsp72. *Curr Immunol Rev* 2006; **2**(3): 209–215.
99. Atamaniuk J, Stuhlmeier KM, Vidotto C, Tschan H, Dossenbach-Glaninger A, Mueller MM. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *Eur J Appl Physiol* 2008; **104**(4): 711–717.
100. Johnson JD, Campisi J, Sharkey CM, Kennedy SL, Nickerson M, Fleshner M. Adrenergic receptors mediate stress-induced elevations in extracellular Hsp72. *J Appl Physiol* 2005; **99**(5): 1789–1795.
101. Pedersen BK, Toft AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med* 2000; **34**(4): 246–251.
102. Pedersen BK, Nieman DC. Exercise immunology: integration and regulation. *Immunol Today* 1998; **19**(5): 204–206.
103. Rogers CJ, Zaharoff DA, Hance KW, *et al.* Exercise enhances vaccine-induced antigen-specific T cell responses. *Vaccine* 2008; **26**(42): 5407–5415.
104. Woods J, Lu Q, Ceddia MA, Lowder T. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise-induced modulation of macrophage function. *Immunol Cell Biol* 2000; **78**(5): 545–553.
105. Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK. Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol* 2002; **168**(6): 2997–3003.
106. Enoka RM. Mechanisms of muscle fatigue: Central factors and task dependency. *J Electromyogr Kinesiol* 1995; **5**(3): 141–149.
107. Gandevia SC, Enoka RM, McComas AJ, Stuart DG, Thomas CK. Neurobiology of muscle fatigue. Advances and issues. *Adv Exp Med Biol* 1995; **384**: 515–525.
108. LaPerriere A, Klimas N, Fletcher MA, *et al.* Change in CD4+ cell enumeration following aerobic exercise training in HIV-1 disease: possible mechanisms and practical applications. *Int J Sports Med* 1997; **18** (Suppl 1): S56–S61.
109. Dwyer D, Browning J. Endurance training in Wistar rats decreases receptor sensitivity to a serotonin agonist. *Acta Physiol Scand* 2000; **170**(3): 211–216.
110. Dwyer D, Flynn J. Short term aerobic exercise training in young males does not alter sensitivity to a central serotonin agonist. *Exp Physiol* 2002; **87**(1): 83–89.
111. Foley TE, Greenwood BN, Day HE, Koch LG, Britton SL, Fleshner M. Elevated central monoamine receptor mRNA in rats bred for high endurance capacity: implications for central fatigue. *Behav Brain Res* 2006; **174**(1): 132–142.
112. Jakeman PM, Hawthorne JE, Maxwell SR, Kendall MJ, Holder G. Evidence for downregulation of hypothalamic 5-hydroxytryptamine receptor function in endurance-trained athletes. *Exp Physiol* 1994; **79**(3): 461–464.
113. Newsholme EA, Calder P, Yaqoob P. The regulatory, informational, and immunomodulatory roles of fat fuels. *Am J Clin Nutr* 1993; **57** (5 Suppl): 738S–750S; discussion 750S–751S.
114. Struder HK, Weicker H. Physiology and pathophysiology of the serotonergic system and its implications on mental and physical performance. Part II. *Int J Sports Med* 2001; **22**(7): 482–497.
115. Fernstrom JD, Fernstrom MH. Exercise, serum free tryptophan, and central fatigue. *J Nutr* 2006; **136**(2): 553S–559S.
116. Hasegawa H, Piacentini MF, Sarre S, Michotte Y, Ishiwata T, Meeusen R. Influence of brain catecholamines on the development of fatigue in exercising rats in the heat. *J Physiol* 2008; **586**(1): 141–149.
117. Leite LH, Lacerda AC, Marubayashi U, Coimbra CC. Central angiotensin AT1-receptor blockade affects thermoregulation and running performance in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; **291**(3): R603–R607.
118. Roelands B, Goekint M, Buysse L, *et al.* Time trial performance in normal and high ambient temperature: is there a role for 5-HT? *Eur J Appl Physiol* 2009; **107**(1): 119–126.
119. Piacentini MF, Meeusen R, Buysse L, De Schutter G, De Meirleir K. Hormonal responses during prolonged exercise are influenced by a selective DA/NA reuptake inhibitor. *Br J Sports Med* 2004; **38**(2): 129–133.
120. Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, *et al.* IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS Biol* 2010; **8**(8): e1000465. DOI:10.1371/journal.pbio.1000465
121. Bower JE, Ganz PA, Irwin MR, Arevalo JM, Cole SW. Fatigue and gene expression in human leukocytes: increased NF-kappaB and decreased glucocorticoid signaling in breast cancer survivors with persistent fatigue. *Brain Behav Immun* 2010; **25**(1): 147–150.
122. Batulan Z, Shinder GA, Minotti S, *et al.* High threshold for induction of the stress response in motor neurons is associated with failure to activate HSF1. *J Neurosci* 2003; **23**(13): 5789–5798.
123. Chen S, Bawa D, Besshoh S, Gurd JW, Brown IR. Association of heat shock proteins and neuronal membrane components with lipid rafts from the rat brain. *J Neurosci Res* 2005; **81**(4): 522–529.
124. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 2008; **88**(4): 1379–1406.
125. Ament W, Verkerke GJ. Exercise and fatigue. *Sports Med* 2009; **39**(5): 389–422.
126. Pedersen BK, Fischer CP. Beneficial health effects of exercise—the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci* 2007; **28**(4): 152–156.
127. Pedersen BK, Bruunsgaard H, Klokke M, *et al.* Exercise-induced immunomodulation—possible roles of neuroendocrine and metabolic factors. *Int J Sports Med* 1997; **18** (Suppl 1): S2–S7.
128. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* 2000; **80**(3): 1055–1081.
129. Karunanithi S, Barclay JW, Brown IR, Robertson RM, Atwood HL. Enhancement of presynaptic performance in transgenic *Drosophila* overexpressing heat shock protein Hsp70. *Synapse* 2002; **44**(1): 8–14.
130. Karunanithi S, Barclay JW, Robertson RM, Brown IR, Atwood HL. Neuroprotection at *Drosophila* synapses conferred by prior heat shock. *J Neurosci* 1999; **19**(11): 4360–4369.
131. O'Brien K, Nixon S, Glazier RH, Tynan AM. Progressive resistive exercise interventions for adults living with HIV/AIDS. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; (4): CD004248.
132. O'Brien K, Nixon S, Tynan AM, Glazier R. Aerobic exercise interventions for adults living with HIV/AIDS. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (8): CD001796.
133. O'Brien K, Tynan AM, Nixon S, Glazier RH. Effects of progressive resistive exercise in adults living with HIV/AIDS: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *AIDS Care* 2008; **20**(6): 631–653.