



ESCOLA SUPERIOR DE EDUCAÇÃO FÍSICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE / DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGIA

ALINE BITTENCOURT

EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO
SOBRE A EXPRESSÃO DE HSP70: IMPLICAÇÕES NO
METABOLISMO DA GLICOSE E FUNÇÃO CELULAR.

PORTO ALEGRE

2012

ALINE BITTENCOURT

**EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO
SOBRE A EXPRESSÃO DE HSP70: IMPLICAÇÕES NO
METABOLISMO DA GLICOSE E FUNÇÃO CELULAR.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Superior de Educação Física da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de
Bittencourt Jr.

PORTO ALEGRE

2012

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pela incansável dedicação, por compreender minha ausência em momentos importantes, pelo apoio incondicional, mas principalmente por acreditar em mim. Todas as conquistas de que hoje me orgulho devo a ti, minha mãe. Muito obrigada por cada abraço, cada palavra de conforto diante da angústia, por cada gesto de amor. Sem dúvida, não conseguiria chegar até aqui sem ti. Te amo!

Aos meus colegas do laboratório FisCel, em especial, à Rossana Rosa Porto, Sofia Pizzato Scomazzon, Maycon, Maciel Bruxel, Bolívar Bertoldo (BBB), Renan Fresno, Vinicius Cruzat, Thiago Gomes Heck, Mirna Stela Ludwig e Antônio Miragem pelos ensinamentos, apoio, amizade e por tornarem tudo tão melhor.

Aos amigos da Fundação, Jadson, Fernanda, Pauline e Betânia, pela parceria e noites de experimentos bem humoradas.

Um agradecimento especial à Dona Ritinha, uma grande amiga que, entre preocupações, conselhos e torcida, me traz paz e tranquilidade.

Aos professores da Escola Superior de Educação Física, em especial ao professor Alex Branco Fraga.

Ao professor Philip Newsholme, por oportunizar momentos inesquecíveis de convívio e aprendizado.

Ao meu querido orientador Paulo Ivo, por apostar em mim e no meu trabalho, por guiar meus passos ao longo desses quatro anos de constante aprendizado, mas principalmente pela amizade, carinho e paciência. Um verdadeiro anjo em minha vida. Muito obrigada por tudo!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO	12
2.2 O EXERCÍCIO FÍSICO COMO INDUTOR DE HSP70: PAPEL DA CONTRAÇÃO MUSCULAR E ALTERAÇÕES NO FLUXO ENERGÉTICO	14
2.3 HSP70 E INFLAMAÇÃO	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 ANIMAIS.....	21
4.2 EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO	22
4.3 TREINAMENTO	23
4.4 DOSAGEM DE LACTATO PLASMÁTICO.....	23
4.5 ATIVIDADE DA CREATINA QUINASE	24
4.6 ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE	24
4.7 GLICEMIA	25
4.8 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE GLICOGÊNIO	25
4.9 EXPRESSÃO DE HSP70 E iNOS	26
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA E CÁLCULO DE TAMANHO AMOSTRAL.....	27
5. RESULTADOS.....	29
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
9. ANEXOS	54
ANEXO 1. Carta de aprovação do projeto de pesquisa pelo CEUA-UFRGS.	54

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Indução de HSP70 por fatores característicos da contração muscular.

Figura 2. Aumento do lactato plasmático confirma as diferentes intensidades de exercício. Concentração do lactato plasmático de ratos Wistar sedentários ou treinados após uma sessão de exercício de 20 minutos realizada em diferentes intensidades.

Figura 3. 20 minutos de exercício realizado em diferentes intensidades não induz lesão. Dosagem da atividade da Creatina Quinase plasmática de ratos Wistar sedentários ou treinados imediatamente, 2 e 6 horas após uma sessão de exercício de 20 minutos realizada em diferentes intensidades.

Figura 4. Altas intensidades de exercício induzem queda na glicemia. Glicemia de ratos Wistar sedentários submetidos a uma sessão de exercício de 20 minutos realizada em diferentes intensidades.

Figura 5. Diferentes intensidades de exercício físico alteram a concentração de glicogênio muscular e hepático. Concentração de glicogênio no gastrocnêmio, sóleo e fígado de ratos Wistar sedentário ou treinados após uma sessão de exercício de 20 minutos realizada em diferentes intensidades.

Figura 6. Treinamento de oito semanas induz aumento na atividade Citrato Sintase independente da intensidade. Atividade da citrato sintase no gastrocnêmio de ratos Wistar sedentários ou treinados após uma sessão de exercício de 20 minutos realizada em diferentes intensidades.

Figura 7. Altas intensidades de exercício físico previnem o ganho de peso corporal. Peso corporal de ratos Wistar após oito semanas de treinamento realizado em diferentes intensidades.

Figura 8. O exercício físico induz o aumento na expressão de HSP72, HSP73 e iNOS no músculo esquelético. Expressão de HSP72, HSP73 e iNOS no gastrocnêmio de ratos Wistar sedentários ou treinados após uma sessão de exercício de 20 minutos realizada em diferentes intensidades.

Figura 9. Relação entre a expressão de HSP72, concentração de glicogênio e atividade citrato sintase muscular dos animais treinados.

Tabela 1. Classificação das proteínas de choque térmico, divididas de acordo com o peso molecular.

Tabela 2. Progressão das cargas de exercício físico ao longo das oito semanas de treinamento.

LISTA DE ABREVIATURAS

HSF	Fator de transcrição para HSP (heat shock factor)
HSE	Elemento de ligação do HSF ao DNA (heat shock element)
HSP	Proteína de choque térmico
HSP72	Proteína de choque térmico de 72 kDa
HSP73	Proteína de choque térmico de 73 kDa
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP72/73)
HSP90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
NO	Óxido nítrico
GSK3	Glicogênio sintase quinase
GS	Glicogênio sintase
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
AKT	Proteína quinase B
PKCα	Proteína quinase C - subunidade alfa
JNK	c-jun quinase
NF-kB	Fator nuclear kappa B
IKK	IκB quinase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
CS	Citrato Sintase
CK	Creatina Quinase
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
G-6P	Glicose-6-fosfato
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase

HK	Hexoquinase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
KOH	Hidróxido de Potássio
CP	Creatina Fosfato
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico)
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
TLCK	N-tosil-L-lisina clorometil-cetona
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-Dodecil sulfato de sódio (do inglês, sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis)

RESUMO

Para avaliar se diferentes intensidades de exercício físico interferem na imunodeteção de HSP72 e HSP73 muscular, ratos Wistar machos foram submetidos a 20 minutos de exercício com diferentes cargas: 2% (G2), 4% (G4), 6% (G6) e 8% (G8) (% relativa ao peso corporal). Amostras de músculo foram obtidas do gastrocnêmio imediatamente ou 12 h após uma sessão de exercício agudo (AG) e 72 h após 8 semanas de treinamento (TR). Foram analisadas as variáveis expressão de HSP72, HSP73 e iNOS, atividade da citrato sintase (CS) e concentração de glicogênio (para a realização dessa análise o sóleo e fígado também foram extraídos). Adicionalmente, creatina quinase (CK), lactato e glicose plasmáticos foram mensurados a partir de amostras de sangue. HSP72 aumentou em resposta ao TR (G2/G4/G6 = $p < 0.01$; G8 = $p < 0.05$) e HSP73 imediatamente após AG ($p < 0.01$) e em TR (G2/G6 = $p < 0.01$; G4 = $p < 0.05$). iNOS aumentou imediatamente ($p < 0.05$) e 12 h após AG (G4/G8 = $p < 0.01$; G6 = $p < 0.05$). CS aumentou em TR ($p < 0.01$) e CK não apresentou diferença entre os grupos. A glicemia caiu imediatamente após AG (G6/G8 = $p < 0.05$), o lactato aumentou imediatamente após AG (G2/G4 = $p < 0.05$; G6 = $p < 0.01$; G8 = $p < 0.001$) e em TR (G2/G4/G6 = $p < 0.05$; G8 = $p < 0.01$) de acordo com a intensidade. A concentração de glicogênio foi reduzida no gastrocnêmio em AG (G2 = $p < 0.01$ G4/G6/G8 = $p < 0.001$) e aumentada em TR (G6 = $p < 0.05$; G8 = $p < 0.01$). No sóleo, foi reduzida imediatamente (G2 = $p < 0.05$; G4/G6 = $p < 0.01$; G8 = $p < 0.001$) e 12 h após AG (G8 = $p < 0.05$). No fígado, foi reduzida imediatamente (G4/G6 = $p < 0.05$; G8 = $p < 0.01$) e 12 h após AG (G8 = $p < 0.05$). Foi observada uma correlação entre HSP72/HSP73 e com o glicogênio ($r: 0.73$ $p < 0.01$ / $r: 0.55$ $p < 0.03$) e CS ($r: 0.79$ $p < 0.0002$ / $r: 0.61$ $p < 0.01$). Esses resultados sugerem que 1) AG induz a imunodeteção de HSP73 independente da intensidade; 2) TR induz HSP72 e HSP73 na mesma proporção entre os grupos de intensidade moderada; 3) alta intensidade de exercício reduz a imunodeteção de HSP72 e HSP73 4) a indução de HSP70 não é afetada pela baixa concentração de glicogênio muscular, embora possa ser induzida por uma sinalização decorrente da quebra deste metabólito.

ABSTRACT

To examine whether different intensities of physical exercise affect HSP72 and HSP73 immunodetection in skeletal muscle, male Wistar rats performed 20 minutes of swimming exercise at a workload corresponding to 2% (G2), 4% (G4), 6% (G6) and 8% (G8) (% relative to body weight). Muscle was obtained from gastrocnemius immediately or 12 hours after acute bout (AG) and 72 hours after 8wk of training (TR). The samples were analysed for HSP72, HSP73 and iNOS protein expression, citrate sintase (CS) activity and glycogen content (for this analysis soleus and liver also were extracted). In addition, plasma creatine kinase (CK), lactate and glucose was also measured from blood samples. HSP72 was higher in TR (G2/G4/G6 = $p < 0.01$; G8 = $p < 0.05$) HSP73 immediately after AG ($p < 0.01$) and in TR (G2/G6 = $p < 0.01$; G4 = $p < 0.05$) iNOS increased immediately ($p < 0.05$) and 12 hours after AG (G4/G8 = $p < 0.01$; G6 = $p < 0.05$). CS was higher in TR ($p < 0.01$) and CK not show difference between groups. Glucose was reduced immediately after AG (G6/G8 = $p < 0.05$) lactate was higher immediately after AG (G2/G4 = $p < 0.05$; G6 = $p < 0.01$; G8 = $p < 0.001$) and in TR (G2/G4/G6 = $p < 0.05$; G8 = $p < 0.01$) according to intensity. Glycogen was reduced in gastrocnemius immediately after AG (G2 = $p < 0.01$ G4/G6/G8 = $p < 0.001$) and was higher in TR (G6 = $p < 0.05$; G8 = $p < 0.01$) in soleus was reduced immediately (G2 = $p < 0.05$; G4/G6 = $p < 0.01$; G8 = $p < 0.001$) and 12 hours after AG (G8 = $p < 0.05$) in liver was reduced immediately (G4/G6 = $p < 0.05$; G8 = $p < 0.01$) and 12 hours after AG (G8 = $p < 0.05$). Significant correlations were also observed between HSP72/HSP73 and both glycogen (r : 0.73 $p < 0.01$ / r : 0.55 $p < 0.03$) and CS (r : 0.79 $p < 0.0002$ / r : 0.61 $p < 0.01$). These data demonstrated that 1) AG induces HSP73 protein appearance in an independent intensity manner; 2) TR induces HSP72 and HSP73 in the same proportion between moderate intensity groups; 3) high-intensity exercise causes impairment in HSP72 and HSP73 protein immunodetection and 4) HSP70 induction not is affected by low glycogen concentration, although it could be induced by glycogen broken signal.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo do processo evolutivo, organismos sofrem ajustes metabólicos e funcionais a fim de se adaptar as condições impostas pelo ambiente, necessitando de respostas rápidas e eficientes diante de novos desafios, como forma de garantir sua sobrevivência. Um dos fatores determinantes da sobrevivência celular é sua carga energética, monitorada por uma combinação de reações que se adaptam conforme a demanda. O exercício físico é sabidamente forte promotor do gasto energético, induzindo uma queda gradativa na concentração de glicogênio intramuscular durante uma sessão de exercício moderado, que previamente depletado no músculo gastrocnêmio, promove uma forte elevação da forma induzível de HSP70 em sujeitos submetidos a um protocolo de exercício concêntrico prolongado (Febbraio 2002). Diferentes protocolos de exercício físico, incluindo exercício excêntrico, concêntrico não lesivo, aeróbico ou resistivo são capazes de induzir a expressão de HSP70 no músculo esquelético em grande magnitude (Thompson 2002; Febbraio e Koukoulas 2000; Liu 1999). Contudo, a duração e intensidade do esforço físico são fatores determinantes no aumento intramuscular de HSP70, que ocorre tão logo após 2 horas do início de uma sessão de exercício agudo (Walsh 2001).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Alterações funcionais e estruturais são reações biológicas comumente observadas após evento estressante. A resposta do organismo como um todo vai depender da intensidade e duração do estímulo estressor, sendo algumas vezes insuficiente para combater os danos sofridos, necessitando do auxílio de mecanismos de proteção ativados durante tais episódios. Nesse sentido, as proteínas de choque térmico (HSPs) apresentam um papel importante em casos de comprometimento da homeostase celular. Essas proteínas são formadas por uma sequência genômica altamente conservada entre espécies, podendo ser encontrada em organismos eucariotos e procariotos. Isso demonstra a extrema importância dessas proteínas ao longo do processo evolutivo, sendo estas originadas a mais de 2 bilhões de anos. Sua expressão é dependente de um estímulo de estresse químico, ambiental ou fisiológico, induzindo a ativação de seu fator de transcrição (HSF) através de um processo denominado trimerização. Esse processo constitui-se da conversão da forma monomérica inativa do HSF em um heterocomplexo hábil em ligar-se ao DNA com alta afinidade. Nos mamíferos, a família de HSFs é representada por quatro membros: HSF-1, HSF-2, HSF-3 e HSF-4, que agem de forma muito semelhante e apresentam padrões específicos de expressão em diferentes tecidos. Dentre eles, o HSF-1 é o principal regulador desse ciclo em vertebrados, onde é constitutivamente expresso nos principais tecidos e tipos celulares. Em situação de repouso, o HSF-1 encontra-se no citoplasma complexado com proteínas de choque térmico de 70 kDa e 90 kDa, dissociando-se deste fator após estímulo estressor. Quando no núcleo, o HSF-1 é responsável por ligar-se a uma sequência de elementos de choque térmico (HSE) a qual interage com os genes da HSP resultando na ativação transcricional e síntese destas proteínas. Entretanto, níveis elevados de HSP70 e HSP90 podem impedir o processo de trimerização ou agir diretamente na capacidade de ligação desse fator ao DNA (Santoro 2000; Akerfelt 2010). O mecanismo regulador desta resposta inibitória ainda não está totalmente esclarecido, entretanto o *feedback* negativo originado dos produtos dependentes da transcrição do HSF-1 demonstram um importante passo no controle desse ciclo, sendo a resposta ao choque térmico (do inglês *heat shock response*) ajustada conforme o estímulo. Diferenças na

expressão de HSPs encontradas entre populações e tecidos não são causadas somente por uma regulação molecular, mas também devido a uma capacidade natural das células em responder ao estresse de acordo com a necessidade. O acúmulo e aumento na capacidade de sintetizar essa proteína ocorrem após exposição a alterações sistêmicas, conferindo tolerância celular ao estresse. Essa plasticidade aparece através de mudanças ocorridas na atividade do HSF-1, sendo seu pico de ligação ao DNA ajustado após tratamento de choque térmico com temperaturas crescentes (Feder 1996; Krebs 1999; Buckley and Hofmann 2002). Essa adaptação ocorre ao longo da vida e pode ser transmitida por gerações, visto que a deficiência do gene das HSPs induz alterações hereditárias em fibras musculares de mamíferos (Sugimoto 2003).

As HSPs são classificadas e divididas em famílias de acordo com o peso molecular (ver tabela 1). Estas apresentam localização e função específica nas células. Recebem atenção particular, as proteínas encontradas entre 66-78 kDa (HSP70) devido a sua alta expressão em mamíferos. A HSP70 pode ser representada por duas isoformas, a constitutiva (HSP73 ou HSC70) presente nas células em situação basal, e a HSP72 sintetizada rapidamente em condições de estresse (Heck 2008). Essa chaperona molecular reconhece e liga-se a proteínas sintetizadas, dobradas ou localizadas de forma inapropriada, auxiliando na restauração da estrutura e função natural destas, além de manter a integridade de componentes celulares como membrana plasmática, mitocôndria e núcleo (Feder and Hofmann 1999).

<i>NOME</i>	<i>OUTROS NOMES</i>	<i>NÚMERO DE AMINÁCIDOS</i>	<i>GENE CODIFICADOR</i>	<i>FORMA DE INDUÇÃO</i>	<i>PRINCIPAIS FUNÇÕES</i>
HSP110	HSP105; HSP105A; HSP105B; antígeno NY-CO-25;	840-858 aa	HSPH1	Choque térmico; Isquemia;	HSP110 confere resistência celular ao calor e apresentam função chaperona, reduzindo a agregação proteica. Age como um eficiente fator de troca de nucleotídeo (NEF) para atividade citossólica das Hsp70s.
GRP94	HSP90B1; ECGP; GP96; TRA1;	803 aa	HSPC4a	Privação de glicose; Ionóforo de cálcio; Estrogênio; IFN α - γ ; IL-6; Privação de oxigênio; Hipóxia; Anoxia; UV;	Abundante em células secretórias, está presente no lúmen do ER. Previne agregação proteica. 50% homólogo da HSP90.
HSP90	HSP90AA1; HSPN; LAP2; HSP86; HSPC1; HSPCA; Hsp89; HSP89A; HSP90A; HSP90N; HSPCAL1; HSPCAL4	732 aa (HSP90 α) 724 aa (HSP90 β)	HSPC1a	Choque térmico; Frio; Fatores de crescimento; Hipoxia; Glicocorticoides; Estradiol; Prostaglandina A1; Insulina; IL-4; IL-6; Privação de glutatona; Sal; Hipoxia; Infecção; Alcool;	Ambas isoformas da Hsp90 (Hsp90 α e Hsp90 β) são requeridas para a diferenciação e maturação celular, encontrada em grande quantidade no citoplasma, apresenta atividade chaperona. Intermediária no remodelamento proteico após estresse, auxilia na estabilidade da estrutura celular. Interage com diversas co-chaperonas que modulam o reconhecimento de substratos, ciclo ATPase e função chaperona desta proteína.
GRP78	BIP; MIF2; HSP78; FLJ26106;	654 aa	HSPA5	Privação de glicose; Frio; Congelamento; Ionóforo de	Previne agregação proteica no ER e liga-se a proteínas desnaturadas retardando sua

				cálcio; UV;	liberação até completo dobramento.
GRP75	HSPA9B; MOT; MOT2; PBP74; mot-2; CSA; MTHSP75	679 aa	HSPA9	Privação de glicose; Ionóforo de cálcio; UV;	Previne agregação proteica, apresenta papel importante na proliferação celular, resposta ao estresse, facilitando o correto dobramento de proteínas presentes na mitocôndria.
HSP72	HSPA1; HSP70I; HSPA1B; HSP70-1; HSP70-1A; HSP70	641 aa	HSPA1A	Choque térmico; Frio; Seca; Metais pesados; Salt; Ozone; Hipóxia; Anoxia; Isquemia; Infecção; Inflamação; UV; Álcool; Hiperosmolalidade; Exposição a toxinas; Anestésicos; Prostaglandina Ciclopentenônica; Insulina;	Rapidamente induzida durante estresse, essa proteína apresenta função citoprotetora e anti-inflamatória, reconhecendo e ligando-se a proteínas sintetizadas, dobradas ou localizadas de forma inapropriada, mantendo a integridade dos componentes celulares.
HSP70B'	Heat shock 70 kDa protein B'; Heat shock 70kD protein 6 (HSP70B')	643 aa	HSPA6	Choque térmico;	Isoforma da HSP72. Juntas, são as principais HSPs induzidas após choque térmico. Seu gene interage de forma seletiva e não covalente com o ATP e nucleotídeos.
HSP73	HSC70; HSC71; HSP71; HSC73	587 aa	HSPA8	Choque térmico; Seca; Hipóxia; Isquemia;	Constitutivamente expressa, essa proteína é encontrada no citoplasma em situações basais, capazes de se ligar a polipeptídeos para facilitar seu dobramento correto.
HSP60	Cpn 60; GroEL	573 aa	HSPD1	Choque térmico; Frio; Luz; Ozônio; Anoxia; Infecção;	Previne o desdobramento e agregação de polipeptídeos gerados na matriz mitocondrial. Estimulada pela ligação da HSP10.
HSP40	HSPF1; DNAJ1; HDJ1	340 aa	DNAJB1	Choque térmico;	Co-chaperona requerida na catálise de reações, funcionando como fator de troca de nucleotídeo na atividade ATPase da HSP70.
HSP27	CMT2F; HMN2B; HSP28; HSP25; HS.76067; DKFZp586P1322	205 aa	HSPB1	Choque térmico; Estresse oxidativo; Isquemia; Frio; Estrogênio; Infecção; Anoxia; Glicocorticoides;	Chaperona molecular, previne o agregação de proteínas mal sintetizadas ou dobradas de forma irregular, interagindo com mecanismos reguladores da morte celular. Associada a filamentos, mantém a estrutura das células.
α/β cristalina	CRYAA, CRYA1/ CRYAB; CRYA2	175 aa	HSPB4a/ HSPB5a	Choque térmico; Glicocorticoides;	Similar a HSP27.
HSP10	EPF; Cpn 10; GroES	102 aa	HSPE1	Choque térmico;	Facilita o dobramento de proteínas de forma ATP-dependente. Associada a HSP60 pode induzir proteção as funções mitocondriais. Previne apoptose e morte celular.

Tabela 1. Classificação das proteínas de choque térmico, divididas em famílias de acordo com o peso molecular.

2.2 O EXERCÍCIO FÍSICO COMO INDUTOR DE HSP70: PAPEL DA CONTRAÇÃO MUSCULAR E ALTERAÇÕES NO FLUXO ENERGÉTICO

A indução de HSP70 no músculo esquelético tem como papel primordial restaurar as funções normais deste tecido, bem como conferir proteção a células prejudicadas em decorrência de alterações e danos sofridos após estresse, particularmente, no tocante à desnaturação de proteínas que pode ocorrer durante o exercício. Esse fenômeno tem sido observado como efeito resultante da prática de diferentes tipos de exercício físico (Thompson 2002; Febbraio MA e Koukoulas 2000). Uma vez que membros da família das HSP70

promovem a facilitação do transporte de proteínas para a mitocôndria, melhora na integridade estrutural e no fluxo energético dessa organela, o conteúdo de HSP72 tem sido correlacionado com o aumento na capacidade oxidativa de células musculares. Diversos trabalhos têm demonstrado a relação dos elevados níveis desta proteína no músculo esquelético com o aumento na atividade de enzimas mitocondriais após curto período de treinamento (Atalay 2004; Bruce 2003). A expressão de HSP70 apresenta comportamento distinto entre fibras musculares, respondendo ao treinamento com mais eficiência nas fibras rápidas do tipo IIB após uma sessão de exercício moderado, embora o conteúdo basal desta proteína seja maior nas fibras lentas do tipo I (Atalay 2004). A atividade contrátil *per se* é capaz de induzir um aumento significativo no conteúdo de HSP72 em músculo isolado independente de outros estímulos, demonstrando que esse fenômeno pode ser induzido por alterações características da contração muscular. Além disso, o aumento no conteúdo intramuscular desta proteína tem sido associado com a melhora no processo de acoplamento excitação-contração (Stary 2008; Nosek 2000). Está bem estabelecido que a propagação de um potencial de ação e consequente despolarização da membrana eleva os níveis de cálcio no tecido muscular. Em linhagem de células musculares, essa resposta ocorre de forma concomitante com o aumento na expressão do gene e conteúdo proteico de HSP70 em até 4 horas após estímulo elétrico, efeito bloqueado na presença de inibidores desse íon (Jorquera 2009). A HSP70 induzida por outros estímulos estressores como o choque térmico, também tem sua expressão atenuada quando o conteúdo intra ou extracelular de cálcio são diminuídos. Contudo, a via pela qual esse efeito ocorre parece sofrer alterações na presença de inibidores de proteínas quinase, onde a proteína quinase C- α (PKC α) tem sido sugerida como mediadora no processo de ativação do HSF-1, por aumentar a translocação e síntese desse fator em estudos com diferentes tipos celulares (Yamamoto 1994; Jorquera 2009; Holmberg 1998).

Os mecanismos pelos quais o HSF-1 é regulado não estão completamente esclarecidos. Entretanto, acredita-se que ele seja parcialmente controlado por um domínio localizado entre os aminoácidos 221 e 310 em um processo de fosforilação no resíduo de serina específica (Ser303 e 307) (Kline e Morimoto 1997). Um dos mediadores dessa modulação é a proteína glicogênio sintase quinase-3 (GSK3), a qual regula negativamente o fator de transcrição da HSP70 mantendo-o em sua forma inativa no citossol. Quando submetidas a 30 minutos de choque térmico (45°C), células transfectadas com GSK3 β e HSP70-Luciferase apresentam uma alteração no padrão de colocalização do HSF-1, manifestando uma rápida dispersão desse fator do núcleo, onde sua atividade de ligação ao DNA ocorre somente 6 horas após

cultura à 37°C (Bin He 1998). GSK3 é uma serina/treonina quinase associada a diversos processos metabólicos, dentre eles a inibição da enzima glicogênio sintase (GS). Durante a prática de exercício físico agudo, a atividade da GSK3 é diminuída em torno de 30% no músculo vasto lateral, concomitantemente com um forte aumento na ativação da proteína quinase B (PKB/AKT) via fosforilação da serina 473, (Sakamoto 2004), também observada em *in situ* e *in vitro* na resposta a contração muscular de diferentes tipos de fibra. Porém, o tratamento com inibidores de AKT não demonstram ser suficientes para atenuar a inibição de $GSK3\alpha^{Ser21}/\beta^{Ser9}$ e a atividade da GS após estímulo da contração muscular, demonstrando que existem outras vias capazes de inibir GSK3 durante o exercício físico. Portanto, a sinalização intramuscular pode ser induzida pelo próprio processo de contração visto que, a sinalização hormonal por insulina, é altamente dependente da via PI3K/AKT para induzir esses mesmos efeitos (Sakamoto 2002).

Um dos fatores determinantes da sobrevivência celular é sua carga energética, monitorada por uma combinação de reações que se adaptam conforme a demanda. O exercício físico é sabidamente forte promotor do gasto energético onde, no músculo esquelético, é representado pela diminuição na concentração de glicogênio de forma gradativa durante uma sessão de exercício moderado, causando alterações na relação ATP/ADP intramuscular. O aumento na expressão do gene de HSP72 ocorre tempos mais tarde em que a concentração do glicogênio muscular é reduzida a níveis muito baixos durante exercício prolongado. Esses indivíduos foram submetidos ao exercício de cicloergômetro de intensidade moderada, sendo este executado até a exaustão. 40 minutos antes do ponto de fadiga, a expressão do gene de HSP72 foi fortemente aumentada, concomitante com uma redução em torno de 10x da concentração inicial de glicogênio. Interessantemente, os níveis de lactato plasmático haviam retornado aos níveis de repouso, muito provavelmente pelo aumento de sua utilização pelo tecido hepático como resposta ao evento hipoglicemiante encontrado em indivíduos sedentários submetidos ao estresse físico, demonstrando que os níveis de lactato não interferem nem influenciam na resposta dessa proteína ao estresse. Outro dado relevante sobre o controle sistêmico na expressão de HSP muscular é que durante a execução do exercício, a temperatura dos indivíduos se manteve constante até o final do mesmo, sendo esta portanto, uma variável descartável na influência desta resposta durante a prática do exercício (Febbraio e Koukoulas 2000). Está demonstrado que a redução prévia da glicemia é capaz de induzir a expressão de proteínas de choque térmico, assim como a expressão do gene de HSP é estimulada no músculo esquelético durante exercício quando as concentrações de glicose

são comprometidas. Interessante pensar que a sinalização que liga ambas, queda da glicemia e aumento na expressão de HSP70 intramuscular, pode ser a própria utilização do glicogênio muscular, considerando que sujeitos submetidos ao exercício extenuante têm a queda na concentração de glicogênio atenuada quando suplementados com glicose (Febbraio 2002). E ainda, a ingestão de glicose durante 120 minutos de exercício moderado induz alterações no padrão de utilização das vias energéticas. Com o aumento da glicose plasmática, a captação muscular deste metabólito aumenta nos sujeitos suplementados, enquanto que nos demais indivíduos o aumento ocorre na concentração e captação de ácidos graxos livres por esse tecido durante o exercício (Febbraio 2003). Foi recentemente demonstrado que o músculo esquelético de sujeitos com o glicogênio previamente depletado apresenta um aumento considerável na indução do gene e conteúdo proteico de HSP72 após uma sessão de exercício físico não lesivo (Febbraio 2002). Chama atenção neste estudo o fato de a expressão de HSP72 não sofrer alterações nos indivíduos controle após o exercício, considerando que a expressão de HSP72 dobrou naqueles com baixo glicogênio muscular (Febbraio 2002).

O mecanismo molecular responsável pela ligação entre a expressão de HSP70 e o aumento do fluxo energético ainda não está claro. Entretanto, as alterações ocorridas na relação ATP/ADP funcionam como um sinal na ativação de proteínas como o AMPK, capaz de fosforilar GSK3 β diminuindo sua ativação (Choi 2010). O AMPK também é ativado pela elevação nos níveis de Ca²⁺ durante a contração muscular através da Ca/calmodulina (CaMKK) em uma via dependente de LKB1. Sendo assim, a ativação do AMPK por intermediários resultantes da contração muscular, pode funcionar como um estímulo para a indução de HSP70 através da inibição de vias reguladoras do HSF-1 (**Figura 1**). Além disso, HSP70 apresenta alta afinidade aos seus substratos na presença de ADP, compreendendo a cooperação de co-chaperonas para a catálise destas reações, não observadas na presença de ATP. A ligação de ATP promove uma rotação de dois principais subdomínios da HSP70, aproximando-os e estabilizando uma conformação fechada, que por fim, estimula a abertura do domínio de ligação de substrato C-terminal (SBD) dessa proteína, resultando na liberação de polipeptídios e subsequente diminuição da atividade chaperona da HSP70 (Woo 2009). Portanto, o próprio estresse causado pelo déficit de energia e consequente diminuição do ATP intramuscular durante o exercício físico funciona como um sensor no estímulo da atividade de HSP70, diretamente envolvida com caminhos relacionados ao controle metabólico celular.

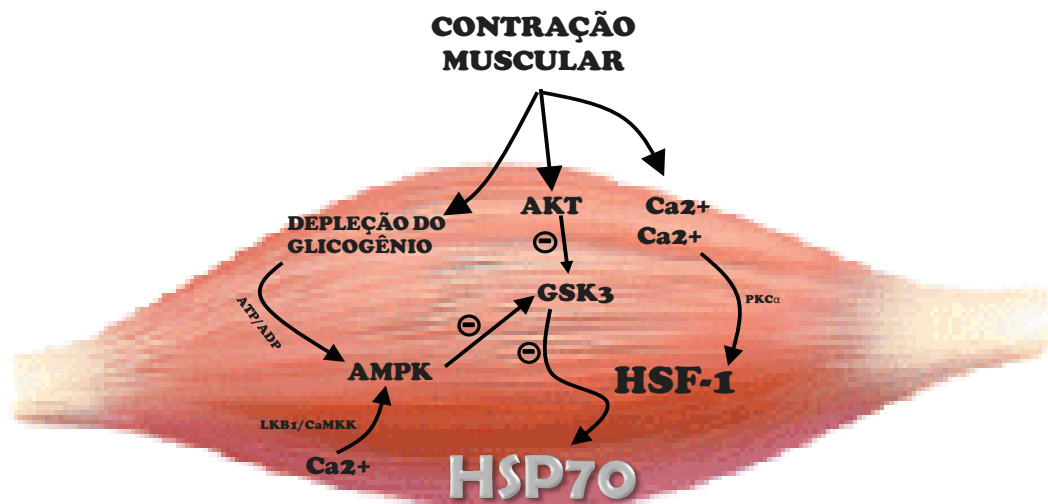


Figura 1. Indução de HSP70 por fatores característicos da contração muscular. O exercício físico é sabidamente capaz de provocar alterações sistêmicas e assim induzir a expressão intramuscular de HSP70. Entretanto, sabe-se que a contração muscular *per se* é suficiente para provocar esse fenômeno. A despolarização da membrana resulta na elevação dos níveis de Ca²⁺, atividade da AKT^{Ser473} seguida pela fosforilação da GSK3 α ^{Ser21}/ β ^{Ser9}, também inibida por AMPK. O AMPK por sua vez, é ativado pela depleção do glicogênio e liberação de Ca²⁺ durante a contração muscular em um caminho dependente de LKB1. Isso induz o aumento na atividade de HSF-1 e síntese da proteína de choque térmico de 70kDa (HSP70).

2.3 HSP70 E INFLAMAÇÃO

NF- κ B é um fator de transcrição originalmente descoberto em linfócitos B, essencial para diversas sinalizações da resposta inflamatória, função imune, ativação de células endoteliais e controle do crescimento celular (Barnes and Karin 1997). O NF- κ B é normalmente localizado no citoplasma ligado a uma proteína inibitória chamada I κ B. Uma variedade de estímulos inflamatórios podem utilizar um caminho de sinalização específica, hábil em inativar I κ B através da fosforilação do mesmo por I κ B quinase (IKK) induzindo sua degradação. Desta forma, o NF- κ B é liberado, possibilitando sua translocação ao núcleo e consequente ligação ao DNA, na qual é efetivamente responsável pela expressão de genes inflamatórios (Ghosh 1998; Snyder 1992). Os genes-alvo incluem os da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), da óxido-nítrico sintase induzível (iNOS), de diversas citocinas inflamatórias e quimiotáticas, receptores de citocinas, moléculas de adesão celular, assim como genes virais (Santoro 2000). O complexo IKK é composto por duas subunidades: IKK α e IKK β , os quais dependem da presença do IKK γ para devida interação. HSP70 pode prevenir o desenvolvimento de diversas

doenças consequentes de inflamação crônica por desnaturar IKK através de uma ligação direta com IKK γ (Ran 2004), tendo em vista que camundongos obesos apresentam um aumento na taxa de fosforilação do IKK α/β (Ser180/181), completamente revertido em camundongos transgênicos HSP72^{+/+} (Chung 2008). HSP72 também tem um papel importante na regulação da atividade do NF- κ B não somente por atuar sobre o complexo IKK, mas também por ativar I κ B em tecidos como o músculo esquelético (Ohno 2010). Outro mecanismo sugerido é através de uma possível inibição competitiva provocada pelo HSF-1, diminuindo a capacidade de ligação do NF- κ B ao DNA quando ativado (Song 2008). Essa regulação pode limitar a expressão de intermediários da cascata inflamatória como a iNOS, visto que sua ativação é fortemente estimulada pelo NF- κ B (Griscavage 1996; Zou 2008). Células transfectadas com HSP70 apresentam a expressão do gene da iNOS diminuída após estímulo estressor, restringindo a produção e liberação de NO por estas células (Song 2008).

IKK e NF- κ B também respondem por outras quinases como p38MAPK, componente central na resposta ao estresse podendo induzir diversos danos às células. p38 é ativada por fosforilação na Thr180/Tyr182, e é capaz de estimular a atividade do NF- κ B mesmo na ausência de IKK (Jijon 2004). A indução de HSP72 pode comprometer a atividade da p38 em diferentes situações. Em coração isolado a taxa de fosforilação da p38 cai pela metade em resposta à isquemia (Pantos 2001) enquanto que em linhagens celulares, sua atividade é fortemente diminuída após tratamento com diferentes estimuladores de HSP72 (Gabai 1997). Estudos prévios indicam que a ação anti-apoptótica da HSP72 tem alvos específicos como a sinalização para ativação de c-jun NH₂-terminal quinase (JNK), proteína induzida por diferentes estímulos de estresse (Yaglom 1999). Situações de desafio como exercício físico ou tratamento com choque térmico induzem o bloqueio de mediadores da resposta inflamatória como JNK e IKK no músculo esquelético (Gumpt 2009). Efeitos provocados pelo aumento na taxa de fosforilação de JNK como intolerância à glicose e resistência à insulina, são atenuados ou completamente revertidos após tratamento com choque térmico (Chung 2008). O mecanismo de inibição do JNK responde rapidamente e de forma dose-dependente em linhagens de células NIH 3T3 de fibroblastos previamente chocadas. Entretanto, essa regulação não sofre interferência das vias de estimulação do JNK tais como MEKK1, SEK1 e outras MAPKs como Erk e p38, mas sim através de uma interação direta entre JNK1 em um domínio específico da HSP72. Essa interação induz uma diminuição na atividade de JNK bem como a interação com seu substrato c-jun (Park 2001a; Park 2001b). Mecanismos adicionais incluem a habilidade da HSP72 em interferir na cascata de fosfatases de JNK (Geiger 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito de diferentes intensidades de exercício físico na expressão de HSP72, HSP73 e iNOS do músculo esquelético de ratos, bem como a relação destes parâmetros com as alterações encontradas na concentração de glicogênio em resposta ao treinamento físico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- verificar o efeito de diferentes intensidades de exercício físico de natação na expressão de HSP72, HSP73 e iNOS do gastrocnêmio extraído de ratos sedentários imediatamente e 12 horas após uma sessão de exercício.
- verificar o efeito de diferentes intensidades de exercício físico de natação na concentração de glicogênio do gastrocnêmio, sóleo e fígado extraído de ratos sedentários imediatamente e 12 horas após uma sessão de exercício.
- verificar o efeito de diferentes intensidades de exercício físico de natação na expressão de HSP72, HSP73 e iNOS do gastrocnêmio extraído de ratos treinados.
- verificar o efeito de diferentes intensidades de exercício físico de natação na concentração de glicogênio do gastrocnêmio, sóleo e fígado extraído de ratos treinados.
- Estabelecer a relação entre as diferentes intensidades de exercício físico agudo, bem como a resposta ao treinamento na expressão de HSP72, HSP73, capacidade oxidativa muscular e as alterações encontradas na concentração de glicogênio em diferentes tecidos relacionados com a produção e utilização energética.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados neste estudo, 160 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *Albinus*) machos de 250-350g obtidos junto ao CREAL do ICBS/UFRGS, mantidos em biotério setorial referente às unidades de pesquisa dos departamentos de Fisiologia e Farmacologia, que se encontra no prédio do ICBS. Foram divididos cinco animais por caixa de polipropileno (33x17x40 cm), 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. Este trabalho foi realizado de acordo com 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 animais foram mortos por decapitação com uso de guilhotina para roedores observados os cuidados éticos para minimizar riscos e sofrimentos dos animais.

A morte dos animais por decapitação ocorreu em um ambiente separado do laboratório, local onde ficaram os demais animais a serem submetidos à eutanásia. O método escolhido para eutanásia baseia-se no fato deste ser um método eficaz, que induz a perda imediata de reflexos, além de produzir mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos. Considerando a necessidade de obtenção de sangue periférico e realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação. O índice de severidade para a morte é sem recuperação. O índice de severidade para o manuseio, nado e treinamento dos animais é considerado como moderado, já que os animais não foram forçados a realizar exercícios à exaustão. A morte dos animais sob anestesia, apesar de desejável, era incompatível com nossos experimentos pois todos os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores (Brown 2005; Saha 2005). Além disso, esses anestésicos interferem nas funções das células envolvidas na produção de hsp70, como os monócitos (Chang 2005). Considerando-se, ainda, que as concentrações plasmáticas do principal objeto molecular do estudo (hsp72) é extremamente afetada (redução completa) por altos níveis de glicose plasmática (Febbraio 2004), portanto, a morte dos animais foi executada sem anestesia.

Após a obtenção dos tecidos destinados para dosagem das variáveis dependentes, as carcaças dos animais foram armazenadas a 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.

4.2 EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO

No exercício agudo os animais sedentários foram aclimatados ao ambiente de natação durante o período de três dias, com a finalidade de minimizar a interferência de uma resposta ao estresse nos dados analisados. A adaptação consistiu na permanência dos animais nos tanques de água aquecida a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 8 minutos por três dias consecutivos que antecederam o dia da realização do exercício. Durante a adaptação não foram colocados pesos na cauda do animal.

O protocolo de exercício compreendeu 20 minutos de natação em tanque, contendo água a uma temperatura entre $31 \pm 1^\circ\text{C}$. Esta temperatura foi escolhida por ser considerada neutra para o animal evitando, assim, que a imersão em água fria amenizasse a elevação da temperatura que acompanhou o exercício ou que o estresse térmico pudesse interferir nos resultados, caso a temperatura da água fosse elevada acima do valor escolhido, conforme já verificado em outros estudos. No momento do nado, foi fixado à cauda dos animais um peso correspondente as intensidades: baixa (2%), moderada (G4%), moderada alta (6%) e alta (G8%) (% do peso corporal), e um grupo que permaneceu em repouso (REP). Os animais foram mortos em diferentes tempos: imediatamente, 2, 6 ou 12 horas após o exercício e as amostras foram encaminhadas para as diferentes análises de acordo com o objetivo do trabalho.

4.3 TREINAMENTO

No treinamento os animais foram adaptados ao ambiente de nado na 1ª semana, em seguida foram submetidos a um treinamento de natação durante 7 semanas onde, a progressão das cargas de exercício ocorreu gradativamente nas diferentes intensidades mencionadas. Os animais foram mortos 72h após a última sessão de exercício.

O protocolo de treinamento foi aplicado conforme a tabela abaixo:

SEMANAS	1	2	3	4	5	6	7	8	
CARGA (% do peso corporal aplicado à cauda)	ADAP	REP	REP	REP	REP	REP	REP	REP	= REP
	ADAP	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	= G2
	ADAP	2%	4%	4%	4%	4%	4%	4%	= G4
	ADAP	2%	4%	6%	6%	6%	6%	6%	= G6
	ADAP	2%	4%	6%	8%	8%	8%	8%	= G8
TEMPO (min)	8	20	20	20	20	20	20	20	

Tabela 2. Progressão das cargas de exercício físico ao longo das oito semanas de treinamento.

4.4 DOSAGEM DE LACTATO PLASMÁTICO

Antes e imediatamente após o exercício, foram extraídos 25µL de sangue do animal por punção caudal para medição de lactato sanguíneo. As extrações foram realizadas nos animais submetidos ao exercício físico agudo, mortos imediatamente após o nado, assim como nos animais submetidos ao treinamento de 8 semanas, mortos 72 horas após a última sessão de exercício. As amostras foram analisadas em lactímetro (Accutrend® Lactate, Roche) sendo o resultado expresso em mMol/L de sangue.

4.5 ATIVIDADE DA CREATINA QUINASE

A enzima Creatina Quinase (CK) catalisa a reação reversível entre a creatina fosfato (CP) e o difosfato de adenosina (ADP) formando creatina e ATP que é consumido na reação da hexoquinase (HK) na presença de glicose de maneira estequiométrica. Esta reação regenera o ATP necessário para a manutenção de quantidades saturantes de substrato para que se possa medir de forma aprimorada a atividade CK presente nas amostras. Posteriormente, a glicose-6-fosfato (G-6P) formada é oxidada a 6-fosfogluconato na presença da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) que gera quantidades estequiométricas de NADPH na presença de NADP^+ . O NADPH formado na unidade de tempo é proporcional à atividade CK presente nas amostras. Sendo assim, para determinar a atividade da Creatina Quinase no plasma, 4 ml de sangue dos animais exercitados e mortos imediatamente, 2 ou 6 horas após a sessão de exercício, foram coletados após o nado em tubo de ensaio tipo falcon contendo 100U de Heparina e em seguida centrifugado ($1500 \times g$) por 10 minutos a uma temperatura ambiente. O plasma foi coletado e armazenado em freezer à -80°C . No momento da análise, as amostras foram descongeladas e submetidas a reação com tampão imidazol (Imidazol 100mM, EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4mM, Glicose 20mM, CP 30mM, ADP 2.8mM, NADP^+ 2.1mM, N-acetilcisteína 20mM, HK 3U/mL e G6PDH 2U/mL) em leitora de microplacas termostatizada à 37°C (Elisa) à 340nm. Os dados obtidos em miliunidades de absorvância/min foram convertidos para U/L à 30°C (compatível com a literatura clínica).

4.6 ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE

A Citrato Sintase (CS) pode ser acompanhada pela medida do surgimento do grupo SH liberado a partir da CoA-SH pelo uso do reativo de Ellman (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico], DTNB) que oxida a coenzima A liberada formando o íon mercaptídeo que absorve fortemente a 412nm. Nenhum outro constituinte do ensaio absorve neste comprimento de onda. O pH é mantido sempre entre 7.4-9.0 para impedir a hidrólise espontânea do DTNB. Sendo assim, para determinar a atividade da Citrato Sintase no músculo esquelético dos animais exercitados, o gastrocnêmio foi extraído imediatamente após uma sessão de exercício agudo ou 72 horas após 8 semanas de treinamento em diferentes

intensidades. O tecido foi homogeneizado em 5mL/g de tampão de extração pH= 7.4 (Tris 50mM, EDTA 1mM) contendo inibidor de protease (Fluoreto de Fenilmetilsulfonila - PMSF 100µM) em homogeneizador de facas Ultra 80. As amostras foram centrifugadas a 150g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise. No momento da análise, as amostras foram descongeladas e submetidas a reação com tampão de ensaio (DTNB 1mM em Tris-HCl pH=8.1, Triton X-100 a 10%), Acetil-CoA 6mM e Oxaloacetato a 10mM (start da reação) em leitora de microplacas termostaticada à 37°C (Elisa) à 415nm. Os dados obtidos em miliunidades de absorbância/min foram convertidos para µmol/g/min de proteína à 37°C.

4.7 GLICEMIA

Para dosar a glicemia dos animais antes e imediatamente após o exercício físico agudo, foram extraídos 25µL de sangue do animal por punção caudal. As amostras foram analisadas em lactímetro (Accutrend® Lactate, Roche) sendo o resultado expresso em mg/dL de sangue.

4.8 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE GLICOGÊNIO

Foram extraídas cerca de 200 mg de amostra dos músculos gastrocnêmio e sóleo bem como do tecido hepático dos animais submetidos ao protocolo de exercício físico agudo, mortos imediatamente ou 12 horas após a sessão de nado, assim como dos animais submetidos ao treinamento de 8 semanas, mortos 72 horas após a última sessão de exercício. As fatias de tecido fresco foram colocadas em tubos de ensaio de parede grossa contendo KOH 30% (m/v). Os tubos foram fechados e colocados em banho fervente a 85°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 4 N e aquecidas em banho fervente a 100°C para induzir a hidrólise das moléculas de glicogênio. A solução foi neutralizada 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 (método enzimático ou de ponto final). A placa foi incubada por 10 min a 37°C e a leitura realizada a 490 nm em leitora de microplacas de ELISA (Bio-Rad, modelo Benchmark). 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.

4.9 EXPRESSÃO DE HSP70 E iNOS

Para determinação da expressão de HSP72, HSP73 e iNOS por Western Blot o músculo gastrocnêmio foi extraído inteiro e coletado em tubo de ensaio tipo falcon contendo SDS 0,1% (5mL/g de tecido) e inibidores de protease (Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF) 100µM, N-tosil-L-lisina clorometil-cetona (TLCK) 20µM, Aprotinina 2µg/mL e Leupeptina 2µg/mL), para serem homogeneizados em homogeneizador de facas Ultra 80. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 16.000g por 1 minuto a temperatura ambiente e o sobrenadante coletado. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976), sendo as amostras diluídas em 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 em gel de poliacrilamida a 10%, para separação durante 4 horas 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 de corrida contendo Tris a 25 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3. Foi usado como marcador de peso molecular 5 µL de mistura de proteínas recombinantes pré-coloridas (RPN800E, GE Health Care) por gel. Para a realização do procedimento de eletrotransferência, onde ocorre a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (GE Health Care-Amersham), foi utilizado o sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100V constantes por 1:30 horas. 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%) e em seguida descoradas com solução TEN (Tris-EDTA-NaCl a respectivamente 50, 5 e 150 mM)-Tween 0,1% (v/v).

O procedimento de imunoblotting foi realizado em aparelho específico com uso de sistema de vácuo (SNAP i.d., MilliPore), otimizando o tempo de reação dos anticorpos sendo 1) incubação instantânea a vácuo com 15 mL de tampão de bloqueio (leite em pó desnatado a 0,5% em TEN-Tween 0,1%); 2) incubação por 10 minutos com anticorpo específico; 3) Três lavagens instantâneas a vácuo com 15 mL TEN-Tween 0,1% após cada incubação.

Para determinar a expressão de HSP72 e HSP73 foi utilizado anticorpo monoclonal anti HSP70 (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%, seguido de anticorpo conjugado com peroxidase HRP (Sigma A9044, Anti-IgG (molécula inteira) de camundongo), a uma diluição de 1:10000 em TEN-Tween 0,1%.

Para determinação da expressão de iNOS foi utilizado anticorpo policlonal anti NOS-2 (Santa Cruz SC-651, produzido em coelho) que reconhece a forma induzível iNOS diluído 1:500 em TEN-Tween 0,1%, seguido de anticorpo conjugado com peroxidase anti-rabbit IgG (Sigma A0545) diluído 1:10000 em TEN-Tween 0,1%.

A imunodeteção foi realizada por quimiluminescência com uso de Luminol, ácido p-coumárico e H₂O₂, sendo a quimiluminescência fotodocumentada (60 fotos, 1foto/10seg) e as imagens quantificadas com auxílio do sistema automático ImageQuant 350 (GE Health Care).

A análise do conteúdo celular de β -Actina foi utilizada como normalizador, obtido por incubação com anticorpo anti β -actina conjugada contendo peroxidase (Sigma A3854, 1:000).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA E CÁLCULO DE TAMANHO AMOSTRAL

O tamanho da amostra foi calculado para detectar a menor diferença esperada entre os grupos, utilizando para o cálculo um poder estatístico de 80%.

O tratamento estatístico foi desenvolvido por procedimentos descritivos e interferenciais onde a comparação entre os grupos foi realizada com o teste de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Tukey para as variáveis expressão de HSP70, expressão de iNOS, glicemia, concentração de lactato plasmático, atividade da creatina

quinase plasmática, atividade citrato sintase muscular e concentração de glicogênio tecidual. Os resultados foram expressos em média \pm desvio-padrão em todas as variáveis e em todos os grupos. Para analisar a relação entre dados obtidos, assim como a resposta dos grupos ao treinamento, os dados brutos de todos os grupos foram combinados e examinados pelo índice de correlação de Pearson. As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS para Windows versão 18.0, sendo considerada significativa a diferença estatística quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

O lactato plasmático é comumente utilizado como um importante indicador da intensidade do exercício aumentando exponencialmente de acordo com a sobrecarga, sendo a lacticemia resultado da produção e utilização de lactato, considerando que a relação de entrada/remoção deste metabólito é mantida com até 6% da carga corporal (concentração crescente até 5.5 mmol/L) em animais submetidos ao exercício físico de natação. Acima disso, a carga aplicada ultrapassa o limiar no qual a produção de lactato é maior do que a remoção realizada durante esforço físico (8% de carga de 6 a 10 mmol/L) (Gobatto 2001; Manchado 2006), consequência da diminuição na capacidade de captação do lactato plasmático pelo tecido hepático, sendo este capaz de remover somente 1/10 do lactato produzido pelo tecido muscular, o qual é fortemente aumentado (Nielsen 2007). Em decorrência disso, utilizamos a dosagem de lactato como indicador de carga de exercício, sendo confirmadas as diferentes intensidades as quais os animais foram submetidos neste protocolo de exercício de natação de curta duração, onde os grupos de baixa e moderada intensidades (G2 e G4) apresentaram um aumento na concentração de lactato plasmático em relação aos animais mantidos em repouso ($p < 0.05$), e idênticos entre si. Os animais submetidos a altas intensidades de exercício (G6 e G8) apresentaram valores maiores referentes a esta variável quando comparados aos demais grupos (G6= $p < 0.01$), sendo maior no animal submetido a 8% de carga ($p < 0.001$). Ao longo do treinamento, os grupos G6 e G8 apresentaram uma diminuição na concentração total de lactato quando comparado com os animais sedentários submetidos a uma sessão de exercício nas mesmas intensidades (G6= $p < 0.002$; G8= $p < 0.007$), demonstrando o efeito do treinamento sobre o aumento da capacidade de utilização energética dos animais após oito semanas de intervenção (**Figura 2**).

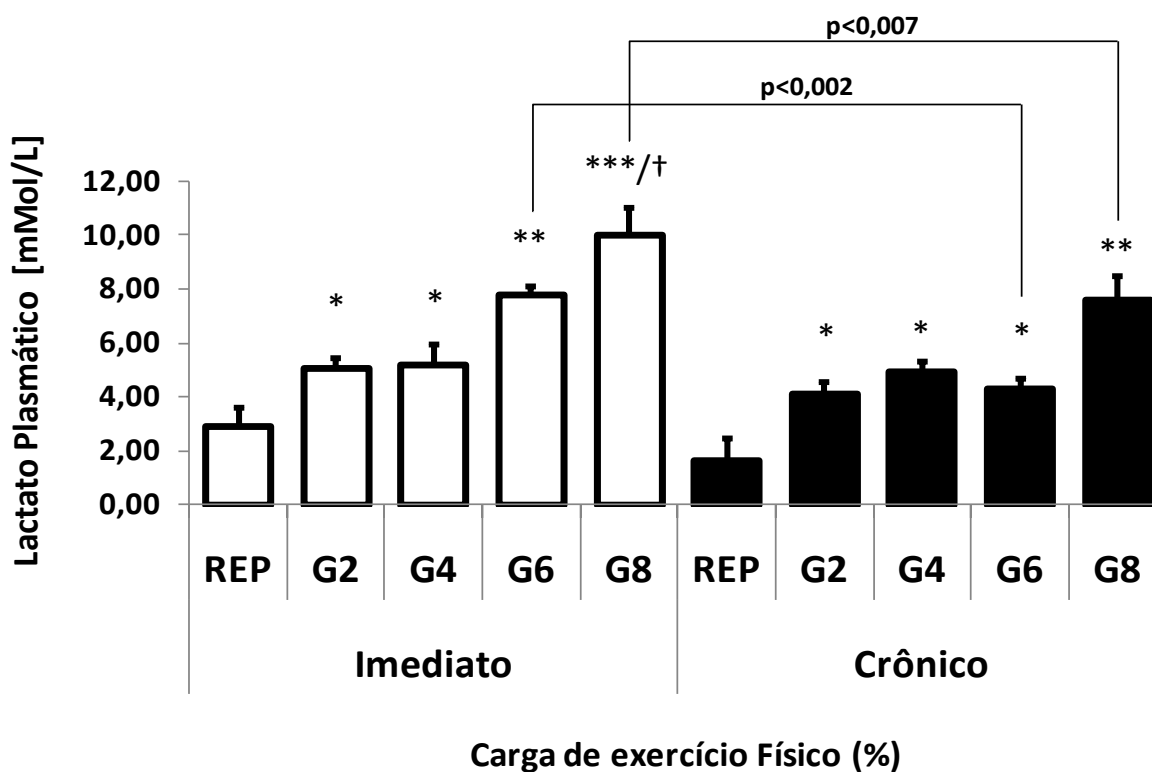


FIGURA 2. Aumento do lactato plasmático confirma as diferentes intensidades de exercício físico. Lactato plasmático (mMol/L) de ratos Wistar após uma sessão de exercício físico de natação (□) ou treinamento de 8 semanas com sessões realizadas 5 vezes por semana (■), ambos com duração de 20 minutos em diferentes intensidades: baixa (G2=2%), moderada (G4=4%), moderada alta (G6=6%) e alta (G8=8%); (% do peso corporal adicionado à cauda), e um grupo que permaneceu em repouso (REP). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ em relação ao REP; † $p < 0,05$ em relação a todos os grupos (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey). Resultados expressos por média \pm desvio-padrão (n=5 por grupo)

A elevação nos níveis séricos de creatina quinase pode indicar um aumento na permeabilidade celular decorrente de dano na membrana tecidual, por ser esta uma enzima geralmente encontrada no tecido muscular esquelético e cardíaco. Durante o exercício, assume-se que o pico de força gerado durante alto impacto da atividade seja o grande responsável pelo dano tecidual encontrado após execução. Embora essa medida seja frequentemente utilizada como marcador indireto do dano muscular ocorrido após a prática de exercício físico excêntrico, sabe-se que essa alteração também está presente como consequência da aplicação de diferentes tipos de protocolo de exercício (Jaffe 1984; Apple 1984; Thompson 2002; Chen 2012). Além disso, a intensidade do exercício parece ter influência direta sobre essa resposta (Chen 2012). Por isso, utilizamos esta medida como

marcador de lesão muscular. Não foram encontradas diferenças na atividade CK plasmática dos grupos de animais submetidos a diferentes intensidades de exercício e o grupo que permaneceu em repouso. Essa resposta foi observada até 6 horas após uma única sessão de 20 minutos de exercício de natação indicando que estes animais, mesmo sedentários, não sofreram lesão muscular decorrente da alta intensidade de exercício (**Figura 3**). Em decorrência destes resultados, não houve necessidade da realização desta dosagem nos animais treinados, sendo que uma única sessão de exercício excêntrico é relatada como sendo capaz de prevenir o aumento na atividade CK plasmática de sujeitos treinados (Thompson 2002).

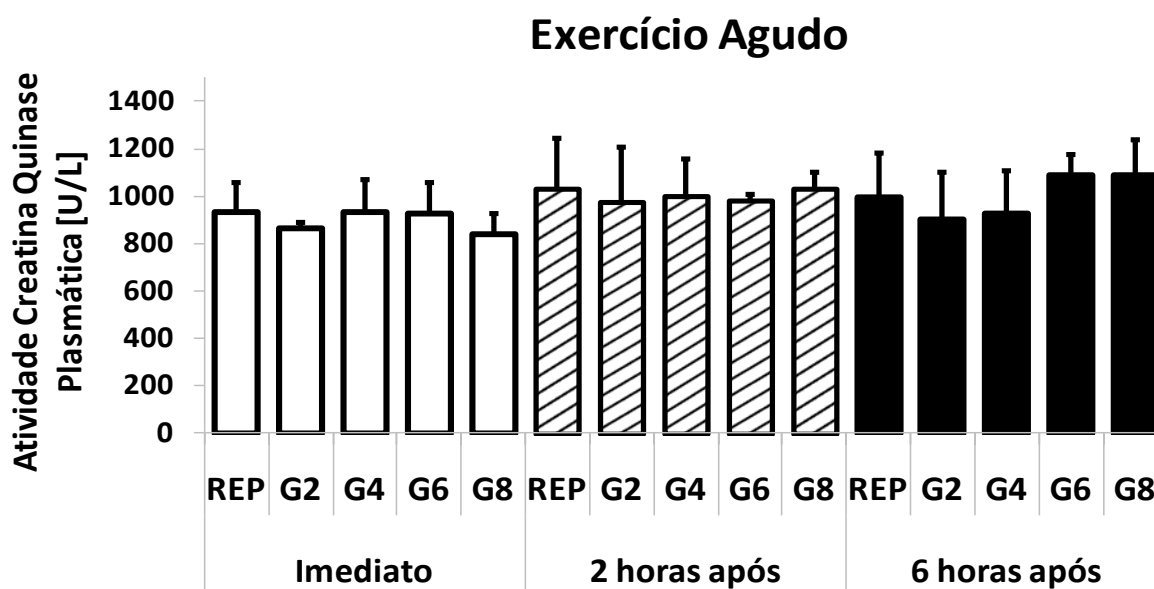


FIGURA 3. 20 minutos de exercício físico realizado em diferentes intensidades não induz lesão. Atividade creatina quinase plasmática (U/L) de ratos Wistar submetidos a 20 minutos de exercício físico de natação realizado em diferentes intensidades: baixa (G2=2%), moderada (G4=4%), moderada alta (G6=6%) e alta (G8=8%); (% do peso corporal adicionado à cauda), e um grupo que permaneceu em repouso (REP). Os animais foram mortos imediatamente (□) 2 horas (▨) ou 6 horas (■) após a sessão de exercício. Resultados expressos por média ± desvio-padrão (n=3 por grupo).

20 minutos de exercício físico de natação em altas intensidades resultaram em uma queda significativa na glicemia dos animais sedentários submetidos a uma única sessão de exercício

($p < 0.05$) (**Figura 3**). Diferentemente, os grupos exercitados em baixa e moderada intensidade (G2 e G4) mantiveram a glicemia estável durante esse período. Com o aumento da intensidade de exercício físico, o tecido muscular se torna o grande responsável por essa queda na glicose plasmática por aumentar o consumo deste metabólito durante o esforço e, apesar de o tecido hepático apresentar um aumento na produção e liberação de glicose em decorrência das altas intensidades de exercício, essa relação parece sofrer um desequilíbrio sendo que o consumo de glicose se apresenta 3x maior do que a produção (Nielsen 2007).

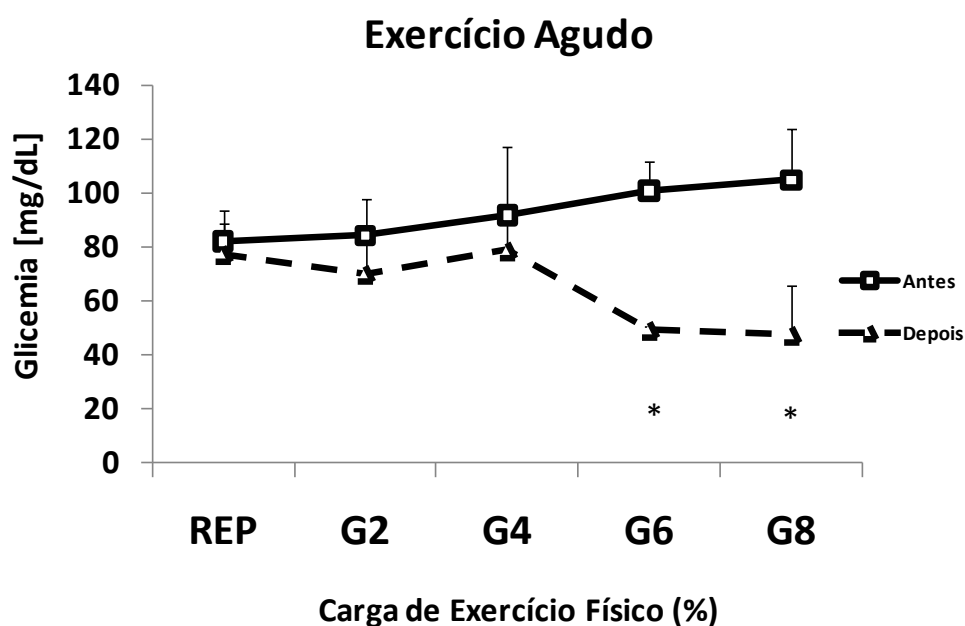


FIGURA 4. Altas intensidades de exercício físico induzem queda na glicemia. Glicemia (mg/dL) de ratos Wistar submetidos a 20 minutos de exercício físico de natação em diferentes intensidades: baixa (G2=2%), moderada (G4=4%), moderada alta (G6=6%) e alta (G8=8%); (% do peso corporal adicionado à cauda), e um grupo que permaneceu em repouso (REP). Os animais foram mortos imediatamente após sessão de exercício. * $p < 0,05$ em relação ao REP e aos grupos antes do exercício (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey). Resultados expressos por média \pm desvio-padrão (n=3 por grupo).

Para avaliar o efeito das diferentes intensidades de exercício sobre a utilização energética, foram realizadas as dosagens do glicogênio no fígado e músculo esquelético, tecidos que apresentam propósitos diferentes quanto à clivagem e utilização deste metabólito. Houve uma queda na concentração do glicogênio nos músculos sóleo (SOL) e gastrocnêmio (GAS) dos animais sedentários submetidos a uma sessão de exercício de curta duração. Efeito este

observado imediatamente após a execução do exercício. Em ambos os tipos de fibra muscular, o conteúdo de glicogênio diminuiu mais nos grupos submetidos a moderada e altas intensidades de exercício (GAS: G2= $p<0.01$; G4, G6 e G8= $p<0.001$ / SOL: G2= $p<0.05$; G4, G6= $p<0.01$ e G8= $p<0.001$). Entretanto, a recuperação do conteúdo intramuscular de glicogênio apresentou comportamento distinto entre as fibras, onde no sóleo do grupo G8 não retornou aos níveis de repouso 12 horas após a sessão de natação ($p<0.05$). Somente o músculo gastrocnêmio apresentou alterações no estoque de glicogênio em resposta ao treinamento de oito semanas em altas intensidades (G6= $p<0.05$ e G8= $p<0.01$) (**Figura 5A-B**). Os grupos de moderada e altas intensidades (G4, G6= $p<0.05$ e G8= $p<0.01$) apresentaram uma queda na concentração do glicogênio hepático imediatamente após a execução do exercício, efeito acentuado no G8, único grupo que não recuperou o conteúdo de glicogênio neste tecido 12 horas após a sessão de natação ($p<0.05$). Nenhum grupo apresentou alteração na concentração de glicogênio hepático após oito semanas de treinamento (**Figura 5C**).

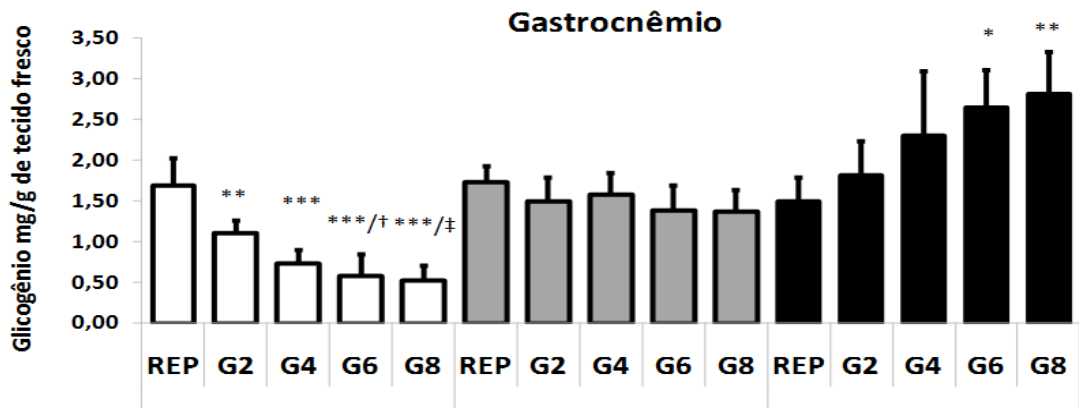
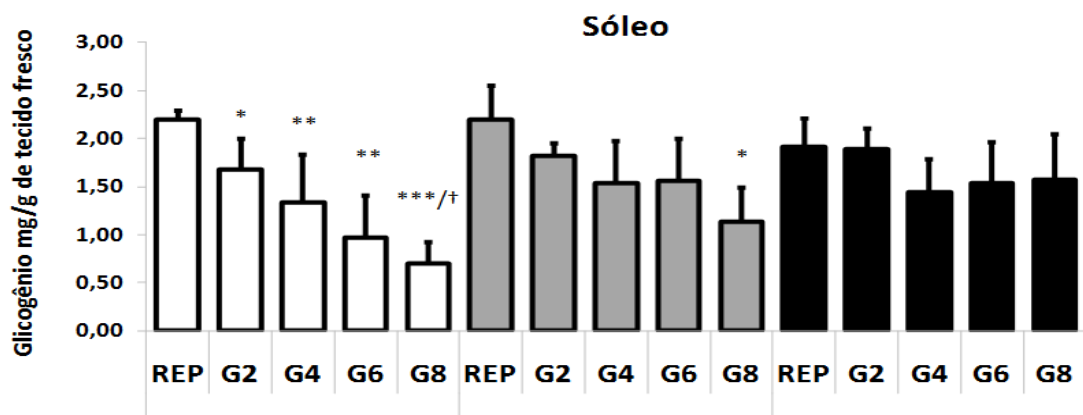
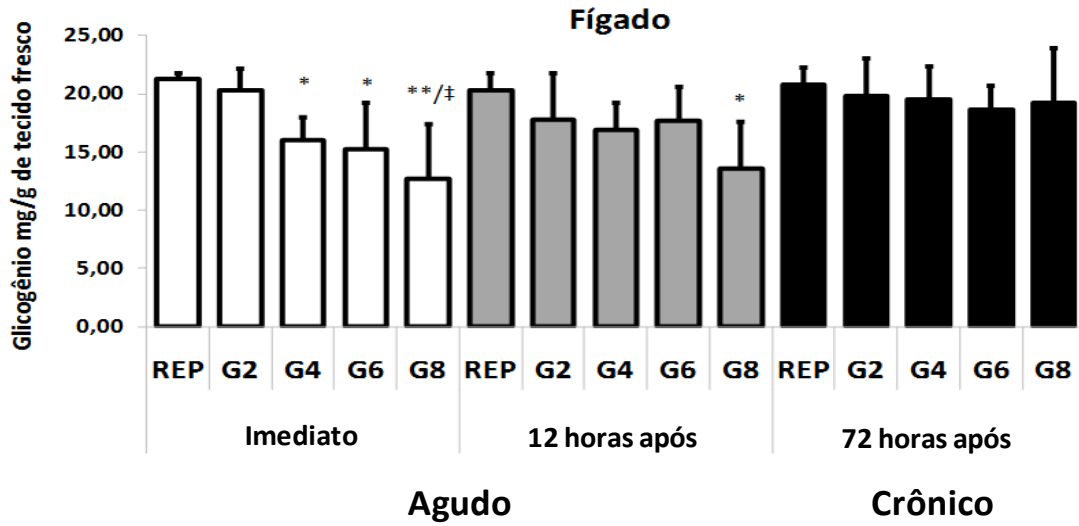
A**B****C**

FIGURA 5. Diferentes intensidades de exercício físico alteram a concentração de glicogênio muscular e hepático. Concentração de glicogênio (mg/g de tecido fresco) no A) gastrocnêmio B) sóleo e C) fígado de ratos Wistar submetidos a 20 minutos de exercício físico de natação em diferentes intensidades: baixa (G2=2%), moderada (G4=4%), moderada alta (G6=6%) e alta (G8=8%); (% do peso corporal adicionado à cauda), e um grupo que permaneceu em repouso (REP). Os animais foram mortos imediatamente (□) e 12 horas (▣) após uma sessão de exercício ou 72 horas após 8 semanas de treinamento realizado 5 vezes por semana (■). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 em relação ao REP. †p<0,05 ‡p<0,01 em relação ao G2 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey). Resultados expressos por média ± desvio-padrão (n=5 por grupo).

Um dos efeitos bem estabelecidos como resposta a frequente prática de exercício físico é o aumento na atividade da citrato sintase muscular (Atalay, 2004). Foi avaliado o efeito das diferentes intensidades de exercício físico sobre esta variável no gastrocnêmio dos animais sedentários submetidos a uma sessão de exercício de natação ou treinados por oito semanas. Verificou-se que o treinamento induziu o aumento da atividade CS em todos os grupos quando comparados ao REP, entretanto, este efeito ocorreu de forma independente da intensidade de exercício aplicada (p<0.01) (**Figura 6**).

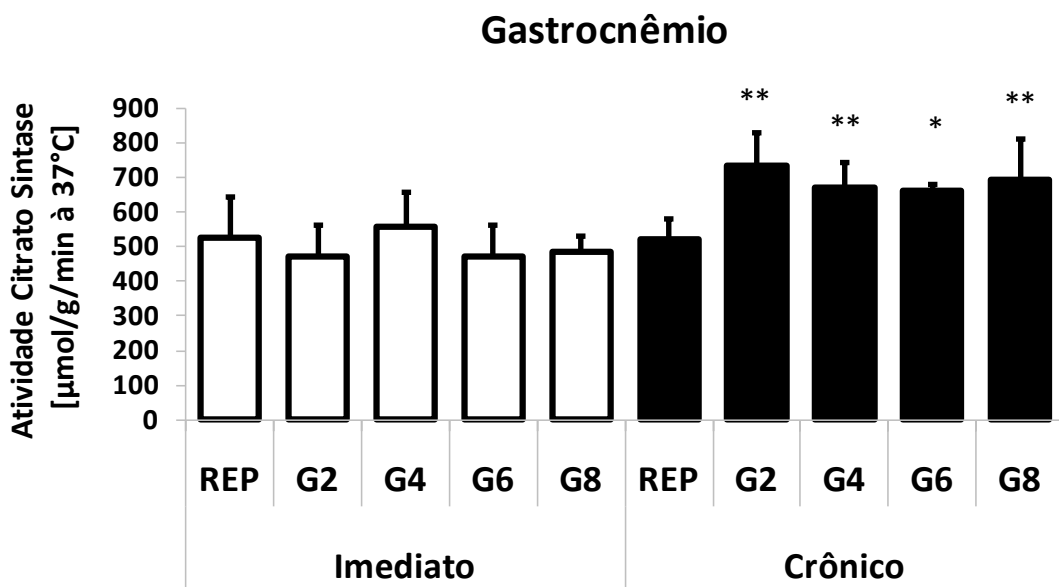


FIGURA 6. Treinamento de 8 semanas induz aumento na atividade CS independente da intensidade. Atividade citrato sintase ($\mu\text{mol/g/min}$) no gastrocnêmio de ratos Wistar submetidos a 20 minutos de exercício físico de natação em diferentes intensidades: baixa (G2=2%), moderada (G4=4%), moderada alta (G6=6%) e alta (G8=8%); (% do peso corporal adicionado à cauda), e um grupo que permaneceu em repouso (REP). Os animais foram mortos imediatamente após uma sessão de exercício (□) ou 72 horas após 8 semanas de treinamento realizado 5 vezes por semana (■). * $p<0,05$ ** $p<0,01$ em relação ao REP (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey). Resultados expressos por média \pm desvio-padrão (n=3 por grupo)

Os animais iniciaram o treinamento físico de natação com 60 dias, pesando em torno de 250 gramas. Os mesmos foram adquirindo peso a cada semana, onde o grupo que permaneceu em repouso (REP) apresentou em média um ganho de 61,57% de peso corporal após oito semanas, relativo ao peso corporal inicial. Diferente disso, os animais exercitados apresentaram um ganho de peso corporal menor quando comparados ao grupo REP, entretanto os grupos de baixa e moderada intensidades de exercício (G2 e G4) não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo não exercitado, compatíveis com os dados encontrados em Oliveira 2007, onde foi demonstrado que animais submetidos ao exercício de natação com até 5% de carga não sofrem alteração no peso corporal após 6 semanas de treinamento. Houve destaque nos grupos submetidos a altas intensidades de exercício físico (G6 e G8= $p<0.05$), os quais apresentaram em média um ganho de 35% de peso corporal total. As diferenças entre os grupos puderam ser observadas desde o início do treinamento sendo que, ao final das oito semanas, os grupos G6 e G8 apresentaram o peso corporal total significativamente menor quando comparados ao grupo REP (**Figura 7**). Desta forma, podemos afirmar que oito semanas de treinamento físico de natação praticado 5 vezes por semana com duração de 20 minutos por sessão é capaz de prevenir o ganho de peso corporal total dos animais submetidos a altas intensidades deste protocolo de exercício, considerando que essa resposta aparece desde a primeira semana de intervenção.

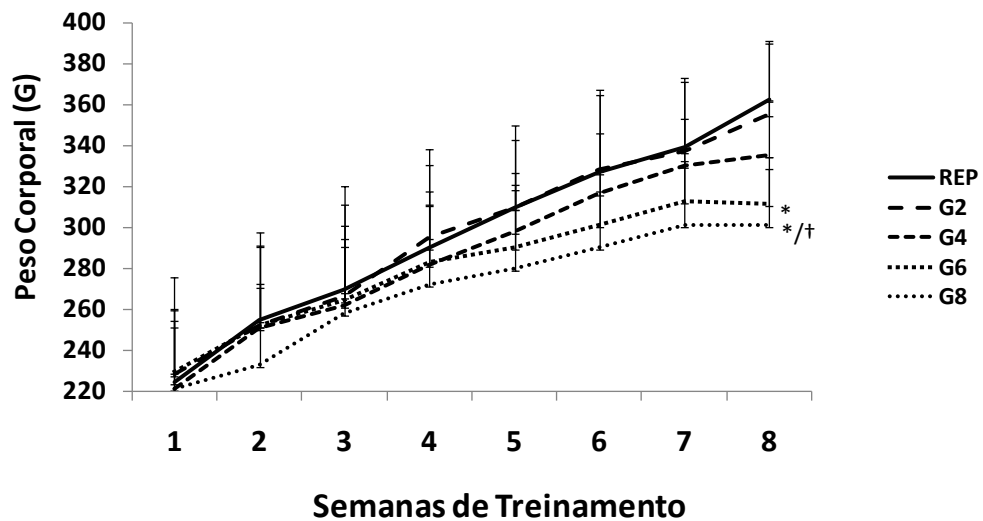


FIGURA 7. Altas intensidades de exercício físico previnem ganho de peso corporal. Progressão do ganho de peso corporal (g) de ratos Wistar ao longo do treinamento de 8 semanas, realizado 5 vezes por semana com a duração de 20 minutos de exercício físico de natação por sessão em diferentes intensidades: baixa (G2=2%), moderada (G4=4%), moderada alta (G6=6%) e alta (G8=8%); (% do peso corporal adicionado à cauda), e um grupo que permaneceu em repouso (REP). Os animais foram mortos 72 horas após a última sessão de exercício. * $p < 0,05$ em relação ao REP † $p < 0,05$ em relação ao G2 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey). Resultados expressos por média \pm desvio-padrão (n=8 por grupo).

O aumento na expressão de HSP72 foi verificado somente no gastrocnêmio dos grupos submetidos ao treinamento de oito semanas, sendo este efeito independente da intensidade nos grupos moderados ($p < 0.01$) e sutilmente mais baixo no grupo de alta intensidade ($p < 0.05$) (**Figura 8A**). O treinamento demonstrou surtir efeito do mesmo modo na expressão de HSP73 (G4= $p < 0.05$ G2 e G6= $p < 0.01$), entretanto o grupo submetido à alta intensidade de exercício (G8) não apresentou a mesma capacidade de adaptação quanto ao conteúdo intramuscular desta proteína, sendo observado valores idênticos aos encontrados nos animais que permaneceram em repouso durante o mesmo período de oito semanas (**Figura 8B**). Imediatamente após uma única sessão de exercício de curta duração, foram encontradas alterações na expressão de HSP73 ($p < 0.01$) e iNOS ($p < 0.05$) no gastrocnêmio de animais sedentários independente da intensidade, sendo este um efeito inesperado, considerando que o aumento intramuscular destas proteínas tem sido demonstrado somente 2 horas após a

execução de exercício moderado (Walsh, 2001). 12 horas após, a expressão de iNOS permaneceu elevada nos grupos exercitados, apresentando diferença significativa nos grupos submetidos a moderada e altas intensidades de exercício (G4, G8= $p<0.01$ e G6= $p<0.05$) (**Figura 8B-C**).

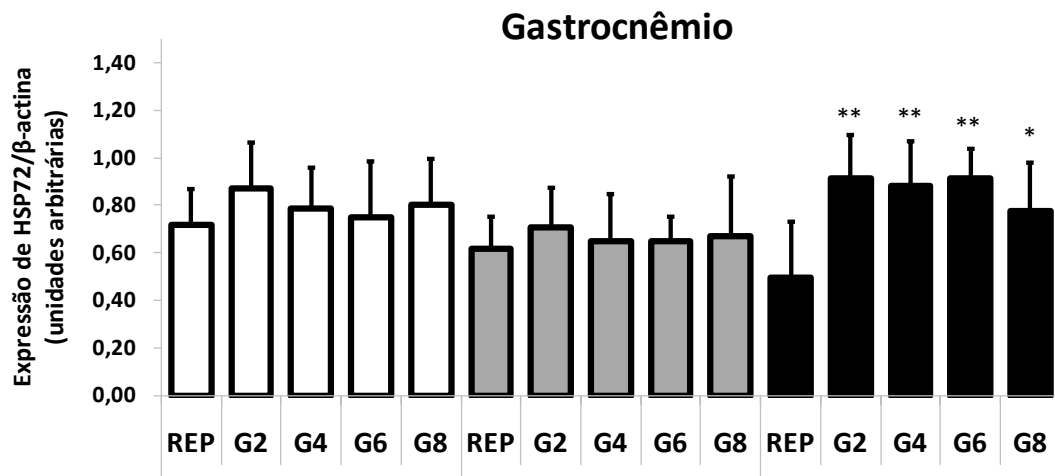
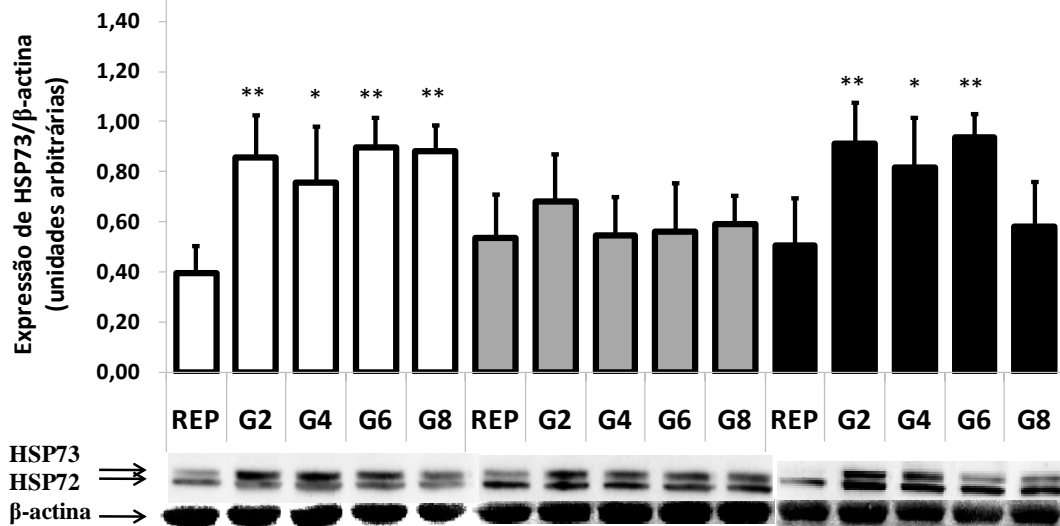
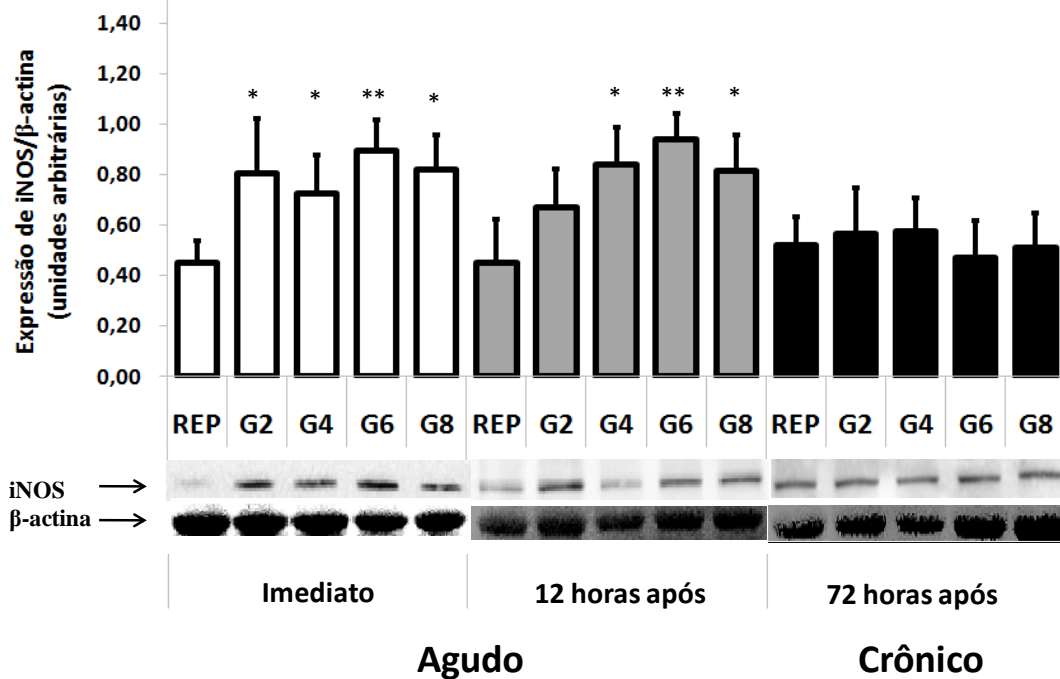
A**B****C**

FIGURA 8. O exercício físico induz aumento na expressão de HSP72, HSP73 e iNOS no músculo esquelético. Expressão de A) HSP72 B) HSP73 e C) iNOS/ β -actina no gastrocnêmio de ratos Wistar submetidos a 20 minutos de exercício físico de natação em diferentes intensidades: baixa (G2=2%), moderada (G4=4%), moderada alta (G6=6%) e alta (G8=8%); (% do peso corporal adicionado à cauda), e um grupo que permaneceu em repouso (REP). Os animais foram mortos imediatamente (□) e 12 horas (▢) após uma sessão de exercício ou 72 horas após 8 semanas de treinamento realizado 5 vezes por semana (■). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao REP. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey). Resultados expressos por média \pm desvio-padrão (n=5 por grupo).

Devido ao aumento na expressão da HSP72 e HSP73 em resposta ao treinamento, julgou-se interessante correlacionar tais variáveis com fatores metabólicos importantes para o desempenho das vias glicolíticas. Assim, podemos perceber que o aumento na expressão de ambas isoformas da HSP70, HSP72 (**Figura 9A**) e HSP73 (**Figura 9B**), apresentaram correlação direta com o aumento na capacidade do músculo gastrocnêmio em estocar glicogênio para uso posterior (HSP72: $r = 0.73$ $p < 0.001$; HSP73: $r = 0.55$ $p < 0.03$) assim como com a elevação na atividade da citrato sintase dos grupos treinados (HSP72: $r = 0.79$ $p < 0.0002$; HSP73: $r = 0.61$ $p < 0.01$).

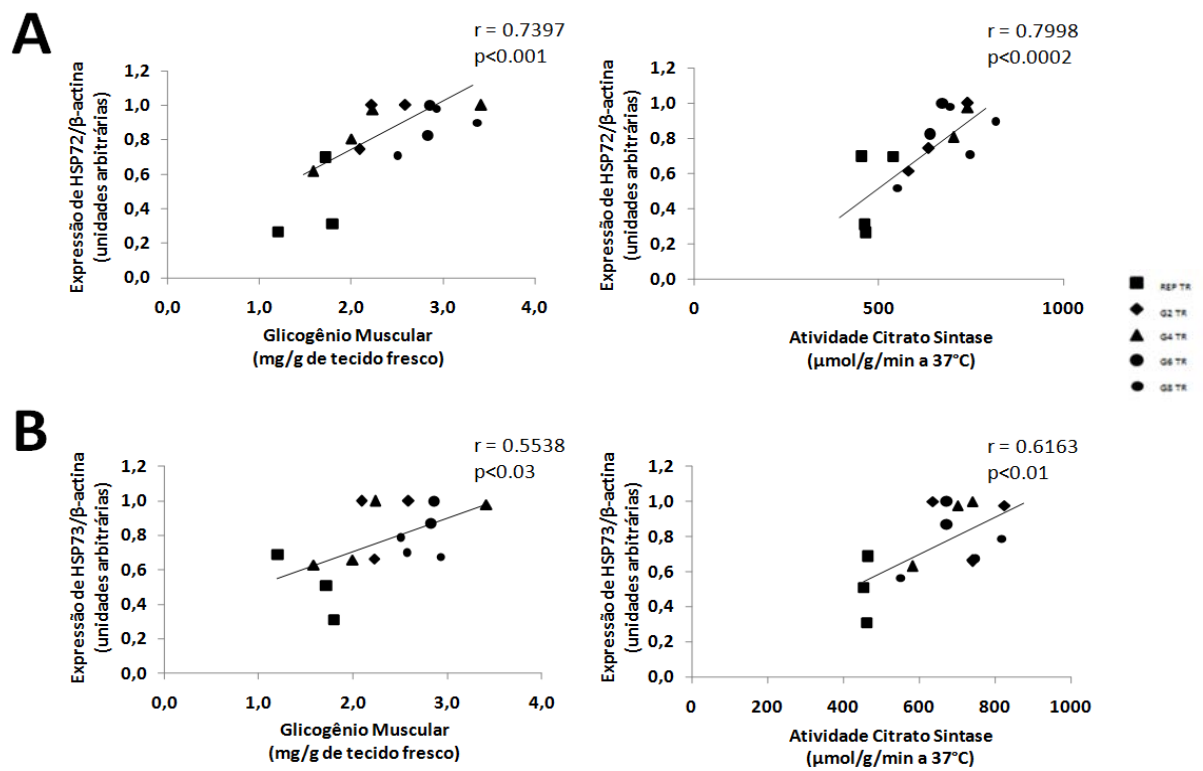


FIGURA 9. Relação entre a expressão de A) HSP72 e B) HSP73 com a concentração de glicogênio e atividade da citrato sintase no gastrocnêmio dos animais treinados.

6. DISCUSSÃO

Esse estudo é o primeiro a demonstrar que, embora haja um aumento na expressão (imunodeteção) de ambas isoformas da HSP70 no músculo esquelético, o efeito do exercício físico ocorre de forma independente da intensidade quanto a esta variável. Essa resposta é percebida particularmente quanto à forma induzível desta proteína (HSP72), apesar de não apresentar alteração frente ao exercício agudo. Em contraponto a estes resultados, a alta intensidade de exercício impossibilitou o aumento na capacidade do músculo em expressar HSP73, adaptação consequente do treinamento observada nos demais grupos.

O exercício físico agudo tem sido associado com o aumento do gene (Febbraio e Koukoulas 2000) e conteúdo proteico de HSP72 no músculo esquelético de ratos (Locke 1990; Salo 1991) e de humanos (Thompson 2001). A expressão de HSP72 também vem sendo observada após a prática de exercício excêntrico indutor de dano muscular (Punschart 1996; Thompson 2001), e concêntrico não lesivo (Febbraio e Koukoulas 2000). Adicionalmente, o mesmo efeito é relatado no músculo esquelético de sujeitos após exercício prolongado (Locke 1990; Salo 1991) ou de curta duração (Thompson 2001). Entretanto, a expressão de HSP70 não sofre alteração quando a carga aplicada varia com relação aos outros protocolos comumente utilizados (Febbraio 2002), demonstrando a importância desse elemento na indução da HSP70 pelo exercício. Maioria dos protocolos de exercício empregados para avaliar o conteúdo intramuscular de HSP70 durante execução são compostos por um período prolongado de tempo, considerando que a expressão do gene desta proteína atinge o pico de expressão após duas horas datadas o início da sessão de exercício (Walsh 2001), sugerindo que o conteúdo de HSP70 não tem como ser mensurado imediatamente após uma sessão de exercício de curta duração. Surpreendentemente, os resultados observados neste trabalho mostram que 20 minutos de exercício de natação é capaz de induzir o aumento da forma constitutiva de HSP70 no músculo esquelético. Acrescido a este resultado, o mesmo pode ser visto quanto a expressão de iNOS, que aumenta nos mesmos grupos de forma independente da intensidade. Sugerindo que o aumento observado na expressão de HSP73 pode não ser originado do tecido muscular, mas sim de células circulantes ativadas durante o exercício (possivelmente, neutrófilos), previamente estimuladas e prontas a responder a estímulos de estresse quando requeridas. Trata-se de uma hipótese que surgiu ao longo do

desenvolvimento deste trabalho e que está sendo testada em experimentos realizados em nosso laboratório.

O protocolo de treinamento utilizado neste estudo se mostrou efetivo, como atestado pelo aumento na atividade da CS em todos os grupos exercitados. Não houve diferença entre as intensidades, as quais foram comprovadas através da inferência de lactato plasmático. Os grupos treinados com alta intensidade apresentaram adaptação quanto aos níveis de lactato comparados aos agudamente exercitados, sendo este mais um parâmetro comprobatório da eficácia do protocolo aplicado. Sabe-se que o treinamento de oito semanas promove um aumento significativo na expressão de HSP72 em diversos tecidos, dentre eles o músculo (Atalay 2004). Não há relatos sobre essa configuração de treinamento comparando a expressão/imunodeteção de HSP70 sob o aspecto de diferentes intensidades. Nossos resultados apontam o efeito repressor da alta intensidade de exercício sobre a capacidade de adaptação do músculo para acúmulo e indução de HSP70 após constante estímulo, o que poderia ser nocivo à fisiologia do músculo esquelético.

Trabalhos recentes mostraram que o aumento da temperatura corporal durante a prática de exercício não é fator relevante no aumento nos níveis de HSP70 muscular (Febbraio e Koukoulas 2000). Em nosso laboratório, medimos a temperatura corporal dos grupos submetidos ao exercício (dados não apresentados), e estes apresentam elevada expressão de HSP70, a despeito de os animais terem mostrado uma queda na temperatura central, descartando a possibilidade de interferência desta variável em nossos resultados. Outros estudos têm relacionado essa proteína com danos teciduais resultantes do exercício (Walsh 2001). A natação provou ser incapaz de induzir esse tipo de dano mecânico frente a nossa inabilidade em detectar mudanças na atividade CK plasmática observada até 6 horas após a sessão de exercício agudo. Desta forma, o aumento da expressão intramuscular da HSP73 não pode ser relacionada com possíveis danos teciduais e, caso venhamos a comprovar nossa hipótese de migração celular, essa não poderá ser considerada como possível sinalização para tal fenômeno.

Dentre as várias alterações consideradas como possíveis causas da expressão de HSP70 intramuscular, mudanças no balanço energético observadas durante a prática de exercício estão entre as mais fortes candidatas. A síntese de membros da família das HSPs tem sido relatada em linhagens celulares após privação de glicose (Sciandra e Subject 1983). A ingestão de glicose previne a diminuição na concentração de glicogênio muscular durante o

exercício. Da mesma forma, essa suplementação evita alterações na expressão de HSP72 deste tecido (Febbraio 2004). Nossos dados não mostram alteração na expressão da HSP72 imediatamente após exercício agudo, o que é esperado. Entretanto, 12 horas depois o mesmo resultado é encontrado. Estudos encontraram HSP70 no músculo esquelético 8 horas após aplicação de exercício prolongado, no qual somando o tempo da sessão resultou em 10 horas e 30 minutos após o início do exercício (Walsh 2001). Essas 8 horas marcaram o pico da expressão de HSP72, retornando aos níveis de repouso somente em 24 horas, enquanto que outros trabalhos observaram elevações no conteúdo desta proteína 48 horas após o exercício (Thompson 2002). Sendo assim, não sabemos dizer se essa proteína realmente não sofreu alteração, ou se isso ocorreu tempos antes da dosagem ser realizada. Como a concentração do glicogênio retornou aos níveis de repouso neste tecido no tempo 12 horas, fica inviável correlacionar esse dois parâmetros com os dados disponíveis atualmente. Quanto ao aumento detectado na expressão de HSP73 imediatamente após exercício agudo, não podemos correlacionar com a queda do glicogênio observada nestes grupos já que é possível haver uma “contaminação” do resultado, já que existe a possibilidade de presença de células sanguíneas migradas para o tecido muscular e não apenas “expressão” da proteína pelas células musculares.

O treinamento por sua vez, induziu evidente adaptação no conteúdo de glicogênio muscular dos animais submetidos às altas intensidades. Ao mesmo tempo, a expressão/imunodeteção de HSP72 e 73 esteve elevada na mesma proporção nos grupos de moderadas intensidades (G2, G4 e G6), enquanto que a alta intensidade de exercício prejudicou esse efeito de ambas isoformas da HSP70 com destaque para a HSP73, não havendo diferença entre alta intensidade e repouso. Curiosamente, apenas o músculo gastrocnêmio apresentou alterações no estoque de glicogênio em resposta ao treinamento de oito semanas em altas intensidades (**Figura 5A-B**), o que pode estar relacionado ao fato de que esse grupo de fibras musculares é o mais intensamente recrutado durante o exercício de natação em ratos (Hutchison et al. 1989). Na figura 9, podemos ver uma correlação direta entre essas variáveis. Portanto, não se pode dizer que existe uma relação inversa entre concentração de glicogênio e expressão de HSP70 relatada em alguns trabalhos, mas que a quebra do glicogênio pode sim ser um sinal para a ativação da via transcricional desta proteína, visto que o glicogênio quando previamente depletado provoca um aumento na expressão de HSP72 no músculo de sujeitos exercitados (Febbraio 2002).

Não comparamos o efeito do exercício agudo com o efeito do treinamento devido às dosagens terem sido realizadas em tempos distintos. Para sabermos somente o efeito do treinamento analisamos estes parâmetros 72 horas após a última sessão de exercício, diferentemente dos grupos exercitados agudamente, os quais foram divididos nos tempos imediato e 12 horas após sessão única de exercício. Esses estudos adicionais estão, no momento, sendo realizados em nosso laboratório.

7. CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou que 1) o exercício agudo de curta duração induz um aumento na expressão de HSP73 muscular independente da intensidade; 2) o treinamento de oito semanas promove um aumento na expressão de HSP72 e HSP73 nas mesmas proporções entre os grupos de moderada intensidade; 3) altas intensidades causam prejuízo na capacidade de expressar HSP72 e HSP73 como forma de adaptação do tecido muscular em resposta ao treinamento; 4) A concentração de glicogênio e a expressão de HSP70 muscular (ambas isoformas), não apresentam relação inversa em resposta ao exercício, mas a quebra do glicogênio pode sim ser um sinal na ativação das vias de transcrição desta proteína;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akerfelt M, Morimoto RI and Sistonen L (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews / Molecular cell Biology* 11.

Apple FS, Rogers MA, Sherman WM, Costill DL, Hagerman FC, Ivy JL (1984). Profile of creatine kinase isoenzymes in skeletal muscles of marathon runners. *Clin Chem.* 30(3):413-6.

Atalay M, Oksala NKJ, Laaksonen DE, Khanna S, Nakao C, Lappalainen J, Roy S, Hanninen O, Sen CJ (2004). Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *J Appl Physiol* 97: 605-11.

Barnes PI and Karin M (1997). Nuclear factor- κ B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England Journal of Medicine* 336: 1066–1071.

Bin He, Meng Y-H, Mivechi NF (1998). Glycogen Synthase Kinase 3b and Extracellular Signal-Regulated Kinase Inactivate Heat Shock Transcription Factor 1 by Facilitating the Disappearance of Transcriptionally Active Granules after Heat Shock. *Molecular and cellular biology* 18: 6624–6633.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.

Brown ET, Umino Y, Loi T, Solessio E, Barlow R (2005). Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. *Vis Neurosci* 22(5):615-8.

Bruce CR, Carey AL, Hawley JA, Febbraio MA (2003b). Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. *Diabetes.* v.52, p.2338-45.

Buckley BA and Hofmann GE (2002). Thermal acclimation changes DNA-binding activity of heat shock factor 1(HSF1) in the goby *Gillichthys mirabilis*: implications for plasticity in the heat-shock response in natural populations. *The Journal of Experimental Biology* 205:3231–3240.

Chang Y, Chen TL, Sheu JR, Chen RM (2005). Suppressive effects of ketamine on macrophage functions. *Toxicol Appl Pharmacol* 204(1):27-35.

Chen TC, Chen HL, Pearce AJ, Nosaka K (2012). Attenuation of Eccentric Exercise-induced Muscle Damage by Preconditioning Exercises. *Med Sci Sports Exerc.* Jun 8. [Epub ahead of print].

Choi SH, Kim YW, Kim SG (2010). AMPK-mediated GSK3 β inhibition by isoliquiritigenin contributes to protecting mitochondria against iron-catalyzed oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 79: 1352–1362.

Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MHS, Mesa JL, Lancaster GI, Southgate RJ, Bruce CR, Duffy SJ, Horvath I, Mestrlil R, Watt MJ, Hooper PL, Kingwell BA, Vigh L, Hevener A, Febbraio MA (2008). HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *PNIS* 105: 1739–1744.

Febbraio MA and Koukoulas (2000). HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 89:1055-1060.

Febbraio MA, Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Nielsen HB, Krstrup P, Ott P, Secher NH and Pedersen BK (2003). Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. *J Physiol* 549.2:607–612.

Febbraio MA, Steensberg A, Walsh R, et al (2002). Reduced glycogen availability is associated with an elevation in HSP72 in contracting human skeletal muscle. *J Physiol* 538(Pt 3):911–917.

Febbraio, MA Mesa, JL Chung, J Steensberg, A Keller, C Nielsen, HB Krstrup, P Ott, P Secher, NH Pedersen, BK (2004). Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein. *Cell Stress Chaperones* 9:390-6.

Feder ME , Cartaño NV, Milos L, Krebs RA and Lindquist SL (1996). Effect of engineering hsp70 copy number on hsp70 expression and tolerance of ecologically relevant heat shock in larvae and pupae of *drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology* 199:1837–1844.

Feder ME and Hofmann GE (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu. Rev. Physiol* 61:243–82.

- Geiger PC and Gupte AA (2011). Heat shock proteins are important mediators of skeletal muscle insulin sensitivity,” *Exercise and Sport Sciences Reviews* 39: 34–42.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998). NF- κ B and rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology* 16: 225–260.
- Gobatto CA, de Mello MAR, Sibuya CY, de Azevedo JRM, dos Santos LA, Kokubun E (2001). Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 130:21-27.
- Griscavage JM, Wilk S, Ignarro LJ (1996). Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-KB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3308-3312.
- Gupte AA, Bomhoff GL, Swerdlow RH, Geiger PC (2009). Heat Treatment Improves Glucose Tolerance and Prevents Skeletal Muscle Insulin Resistance in Rats Fed a High-Fat Diet. *Diabetes* 58: 567–578.
- Heck TG, Schöler CM and Homem de Bittencourt, PI (2011). *Cell Biochem Funct* 2011; 29: 215–226.
- Hoff C (1980). Sounding board. Immoral and moral uses of animals. *N Engl J Med* 302:115-8.
- Holmberg CI, Roos PMK, Lord JM, Eriksson JE, Sistonen L (1998). Conventional and novel PKC isoenzymes modify the heat-induced stress response but are not activated by heat shock. *Journal of Cell Science* 111: 3357-3365.
- Hutchison DL, Roy RR, Hodgson JA, Edgerton VR (1989). EMG amplitude relationships between the rat soleus and medial gastrocnemius during various motor tasks. *Brain Res.* 502:233-44.
- Jaffe AS, Garfinkel BT, Ritter CS, Sobel BE (1984). Plasma MB creatine kinase after vigorous exercise in professional athletes. *Am J Cardiol.* 1;53(6):856-8.
- Jijon H, Allard B, Jobin C (2004). NF-kappaB inducing kinase activates NF-kappaB transcriptional activity independently of IkappaB kinase gamma through a p38 MAPK-dependent RelA phosphorylation pathway. *Cell Signal.* 16(9):1023-32.

- Jorquera G, Juretic N, Jaimovich E, Riveros N (2009). Membrane depolarization induces calcium-dependent upregulation of Hsp70 and Hmox-1 in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C581–C590.
- Kline MP and Morimoto RI (1997). Repression of the Heat Shock Factor 1 Transcriptional Activation Domain Is Modulated by Constitutive Phosphorylation. *Molecular and cellular biology* 17(4): 2107–2115.
- Krebs RA (1999). A comparison of Hsp70 expression and thermotolerance in adults and larvae of three *drosophila* species. *Cell Stress and Chaperones* 4(4):243-249.
- Liu Y, Lormes W, Wang L, Reissnecker S, Steinacker JM (2004). Different skeletal muscle HSP70 responses to high-intensity strength training and low-intensity endurance training. *European Journal Applied Physiology* 91: 330-335.
- Locke M, Noble EG and Atkinson BG (1990). Exercising mammals synthesise stress proteins. *American Journal of Physiology* 258:C723–729.
- Manchado FB, Gobatto CA, Voltarelli FA and de Mello MAR (2006). Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 31: 731–736.
- Nielsen HB, Febbraio MA, Ott P, Krstrup P and Secher NH (2007). Hepatic lactate uptake versus leg lactate output during exercise in humans. *J Appl Physiol* 103:1227–1233.
- Nosek TM, Brotto MAP, Essig DA, Mestril R, Conover RC, Dillman WH, Kolbeck RC (2000). Functional properties of skeletal muscle from transgenic animals with upregulated heat shock protein 70. *Physiological Genomics* 4:25–33.
- Ohno Y, Yamada S, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K (2010). A possible role of NF-kappaB and HSP72 in skeletal muscle hypertrophy induced by heat stress in rats. *Gen Physiol Biophys.* 29(3): 234-42.
- Oliveira CAM, Luciano E, Marcondes MCCG, de Mello MAR (2007). Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. *Journal of Diabetes and Its Complications* 21:258–264.
- Pantos CI, Malliopolou VA, Mourouzis IS, Karamanoli EP, Tzeis SM, Carageorgiou HC, Varonos DD, Cokkinos DV (2001). Long-term thyroxine administration increases heat stress

protein-70 mRNA expression and attenuates p38 MAP kinase activity in response to ischaemia. *Journal of Endocrinology* 170: 207–215.

Park HS, Lee JS, Huh SH, Seo JS, Choi EJ (2001a). Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *Embo J.* 20: 446-56.

Park J and Liu AY (2001b). JNK phosphorylates the HSF1 transcriptional activation domain: role of JNK in the regulation of the heat shock response. *J Cell Biochem.* 82(2): 326-38.

Puntschart A, Vogt M, Widmer HR, Hoppeler H and Billeter R (1996). Hsp70 expression in human skeletal muscle after exercise. *Acta Physiol Scand* 157:411-417.

Ran R, Lu A, Zhang L, Tang Y, Zhu H, Xu H, Feng Y, Han C, Zhou G, Rigby AC, Sharp FR (2004). Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK γ and impairing NF- κ B survival signaling. *Genes & development* 18: 1466–1481.

Saha JK, Xia J, Grondin JM, Engle SK, Jakubowski JA (2005). Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp Biol Med (Maywood).* 230(10):777-84.

Sakamoto K, Arnolds DEW, Ekberg I, Thorell A, Goodyear LJ (2004). Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319: 419–425.

Sakamoto K, Hirshman MF, Aschenbach WG, Goodyear LJ (2002). Contraction Regulation of Akt in Rat Skeletal Muscle. *The journal of biological chemistry* 277: 11910–11917.

Salo DC, Donovan CM and Davies KJA (1991). HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radicals and Biological Medicine* 11:239–246.

Santoro MG (2000). Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* 59: 55-63.

Sciandra JJ and Subjectk JR (1983). The effect of glucose on protein synthesis and thermosensitivity in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry* 258:12 091–12 093.


- Snyder YM, Guthrie L, Evans GF, Zuckerman SH (1994). Transcriptional inhibition of endotoxin-induced monokine synthesis following heat shock in murine peritoneal macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 51: 181– 187.
- Song M, Pinsky MR, Kellum JA (2008). Heat shock factor 1 inhibits nuclear factor-kappaB nuclear binding activity during endotoxin tolerance and heat shock. *J Crit Care.* 23(3): 406-15.
- Stary CM, Walsh BJ, Knapp AE, Brafman D, Hogan MC (2008). Elevation in heat shock protein 72 mRNA following contractions in isolated single skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R642–R648.
- Sugimoto M, Furuoka H, Sugimoto Y. Deletion of one of the duplicated Hsp70 genes causes hereditary myopathy of diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle. *Anim Genet.* 34(3):191-7.
- Thompson HS, Clarkson PM, Scodilis SP (2002). The repeated bout effect and heat shock proteins: intramuscular HSP27 and HSp70 expression following two bouts of eccentric exercise in humans. *Acta Physiol Scand* 174, 47-56.
- Walsh RC, Koukoulas I, Garnham A, Moseley PI, Hargreaves H, Febbraio MA (2001). Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell Stress and Chaperones* 6: 386–393.
- Woo H-J, Jiang J, Lafer EM, Sousa R (2009). ATP-Induced Conformational Changes in Hsp70:Molecular Dynamics and Experimental Validation of an in Silico Predicted Conformation. *Biochemistry* 48:11470–11477.
- Yaglom JA, Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD and Sherman MY (1999). The Function of HSP72 in Suppression of c-Jun N-terminal Kinase Activation Can Be Dissociated from Its Role in Prevention of Protein Damage. *The journal of biological chemistry* 274: 20223–20228.
- Yamamoto N, Smith MW, Maki A, Berezesky IK, Trump BF (1994). Role of cytosolic Ca²⁺ and protein kinases in the induction of the hsp70 gene. *Kidney Int.* 45(4): 1093-104.
- Zou N, Ao L, Cleveland JC Jr, Yang X, Su X, Cai GY, Banerjee A, Fullerton DA, Meng X (2008). Critical role of extracellular heat shock cognate protein 70 in the myocardic

inflammatory response and cardiac dysfunction after global ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H2805–H2813.


9. ANEXOS

ANEXO 1. Carta de aprovação do projeto de pesquisa pelo CEUA-UFRGS.

Página 1 de 1

 **UFRGS**
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO


Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 21357
Título: Descrição de parâmetros bioquímicos e moleculares de ratos em resposta a um protocolo de exercício físico agudo de natação de curta duração e ao treinamento

Pesquisadores:
Equipe UFRGS:
PAULO IVO HOMEM DE BITTENCOURT JUNIOR - coordenador desde 15/06/2011
ALINE BITTENCOURT - pesquisador desde 15/06/2011

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 26/09/2011 - Sala de Reuniões do 2º andar no Prédio da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 4 de Outubro de 2011


FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética

Prof. Dr. Flávio A.P. de Araujo
Presidente da CEUA/UFRGS