

EXPRESSÃO (mRNA) E EXPORTAÇÃO DE HSP70 POR LINFÓCITOS DE LINFONODOS MESENTÉRICOS DE RATOS TREINADOS A DIFERENTES INTENSIDADES E OS EFEITOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR

Stumpf, G. S.^{1,2,3}, Scomazzon, S. P.^{1,2,3}, Bittencourt, A.^{1,2}, Vieira Marques, C.^{1,2}, Scholer, C. M.^{1,2,4}, Miragem, A. A.^{1,2}, Rosa, T. G.^{1,2}, Heck, T. G.^{1,2,4}, Homem de Bittencourt, P. I. Jr.^{1,2}

¹Laboratório de Fisiologia Celular, Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS. Porto Alegre/RS

²INCT de Hormônios e Saúde da Mulher

³Faculdade de Biomedicina, UFCSPA. Porto Alegre/RS

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, ESEF, UFRGS. Porto Alegre, RS.

Contato: Laboratório de Fisiologia Celular, Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS. Rua Sarmento Leite, 500 – 2º andar, lab. 02.

Telefone: (51) 33083151; **fax:** (51) 33084555; **email:** fisiologia.celular@ufrgs.br ; **web:** www.ufrgs.br/fisiologia/fisiologiacelular

Introdução

Proteínas de choque térmico de 70kDa (HSP70) são expressas frente a situações estressantes, como o exercício físico extenuante e/ou choque térmico. Entre outras funções, destaca-se o seu papel citoprotetor e antitumoral da HSP70, bloqueando vias inflamatórias como a do NF-κB. Como o exercício promove adaptações imunológicas, nosso estudo busca a utilização da HSP70 como um marcador da função imunológica durante o treinamento físico.

Objetivos

- Verificar a influência do treinamento físico em diferentes intensidades na expressão de mRNA e na exportação de HSP70 em linfócitos de linfonodos mesentéricos.
- Verificar a influência do treinamento físico em diferentes intensidades na proliferação dos linfócitos.
- Avaliar se há modificação desses parâmetros quando as células são submetidas a outro evento estressor (choque térmico).

Métodos

Animais:
• 10 ratos Wistar
• Adultos
• Machos
• ±250g



Fig1: figura ilustrativa dos animais durante o exercício.

Treino:
• 5 dias / semana
• 8 semanas seguidas
• Água à 30°C
• Com carga progressiva:

| | Rep | G2% | G4% | G6% | G8% |
|-------------|----------|---------|---------|---------|---------|
| 1ª Sem | 10 ratos | | | | |
| 2ª Sem | 2 ratos | 8 ratos | | | |
| 3ª Sem | 2 ratos | 2 ratos | 6 ratos | | |
| 4ª Sem | 2 ratos | 2 ratos | 2 ratos | 4 ratos | |
| 5ª à 8ª Sem | 2 ratos | 2 ratos | 2 ratos | 2 ratos | 2 ratos |

Sacrifício (To)
• 72h após última sessão de treino
• Decapitação
• Extração dos linfonodos mesentéricos
• Extração dos linfócitos
• Recolhimento de 10⁶ células para PCR
• Recolhimento de 10⁶ células para proliferação

Quantificação do mRNA:
• Real-time rt-PCR
• Primers para HSP72 e 73 e β-actina

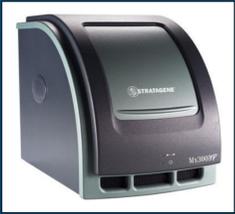


Fig2: figura ilustrativa da aparelhagem utilizada para a quantificação de mRNA de HSP72 e 73.

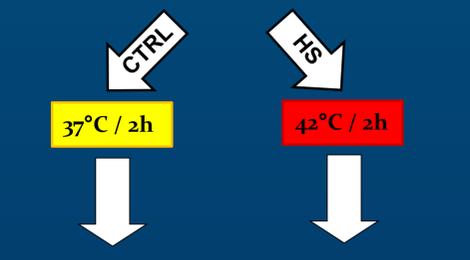
Quantificação da HSP72 Exportada:
• Kit EKS-700b® para HSP72 (ELISA)



Fig3: figura ilustrativa da aparelhagem utilizada para a quantificação de HSP72 exportada.

Avaliação da proliferação:
• Incorporação de [2-14C] timidina

Procedimento de Choque térmico (T2h)
• Meio RPMI 1640
• 2 horas em banho-maria
• Recolhimento de 10⁶ células para PCR
• Recolhimento do meio para análise



Cultura (T6h)
• Meio RPMI 1640
• 6 horas à 37°C / 5%CO2
• Recolhimento de 10⁶ células para PCR
• Recolhimento de 10⁶ células para proliferação
• Recolhimento do meio para análise

Resultados

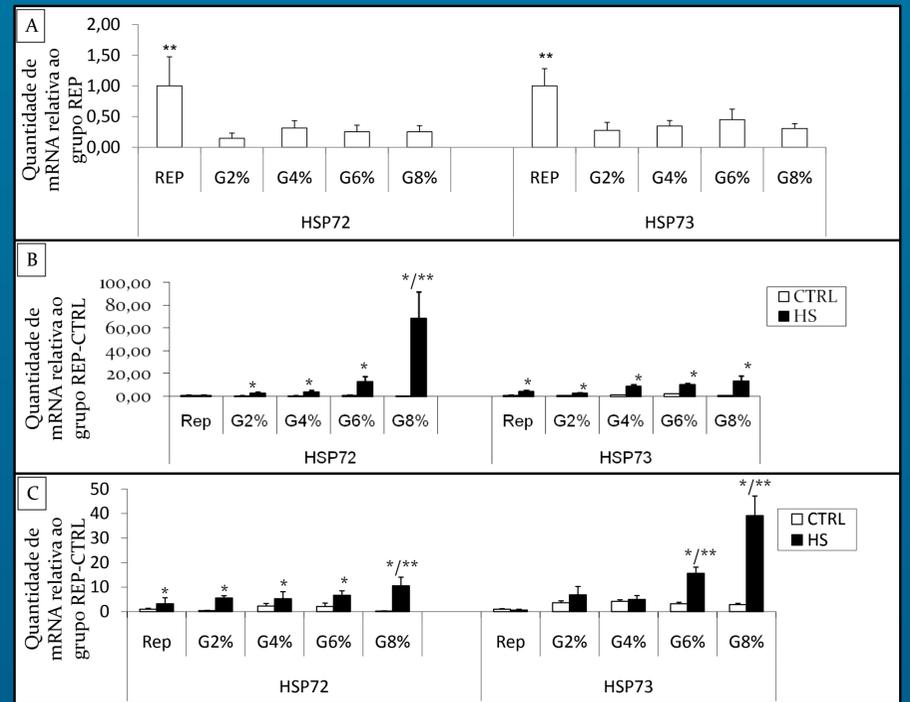


Fig4: gráfico ilustrando as quantidades de mRNA de HSP presentes nas células logo após o sacrifício (A); após as 2h de banho-maria (CTRL - 37°C, ou HS - 42°C) (B); e após as 6h de cultura (CTRL - 37°C, ou HS - 42°C) (C). Dados expressos em média ± desvio padrão, em relação ao grupo REP-CTRL, e analisados por ANOVA de uma via, Student Neuman Keuls, p<0,05, SPSS v.13.0. * diferença significativa em relação ao próprio grupo na condição de 37°C (resposta ao choque térmico). ** diferença significativa em relação a todos os grupos.

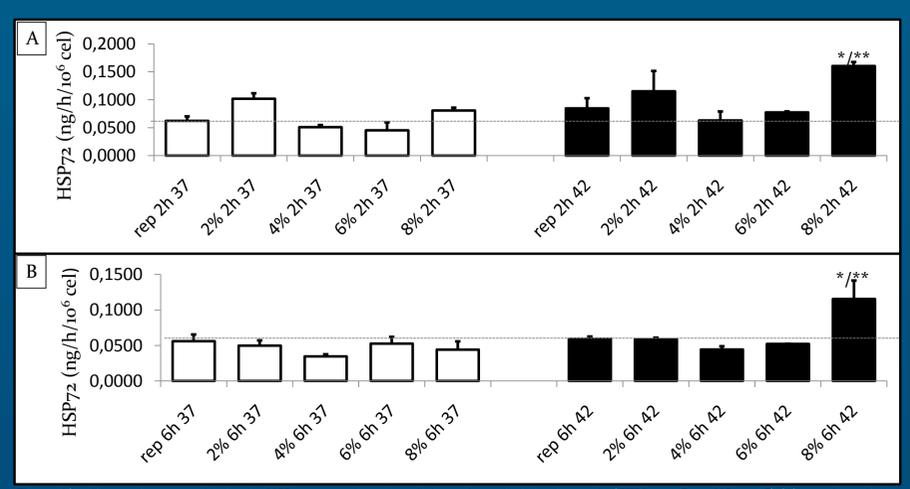


Fig5: gráfico ilustrando as quantidades de HSP72 exportadas pelas células após as 2h de banho-maria (CTRL - 37°C, ou HS - 42°C) (A); e após as 6h de cultura (B). Resultado expresso em ng/hora/10⁶ células. Dados expressos em média ± desvio padrão analisados por ANOVA de uma via, Student Neuman Keuls, p<0,05, SPSS v.13.0. * diferença significativa em relação ao respectivo controle (37°C). ** diferença significativa em relação a todos os grupos.

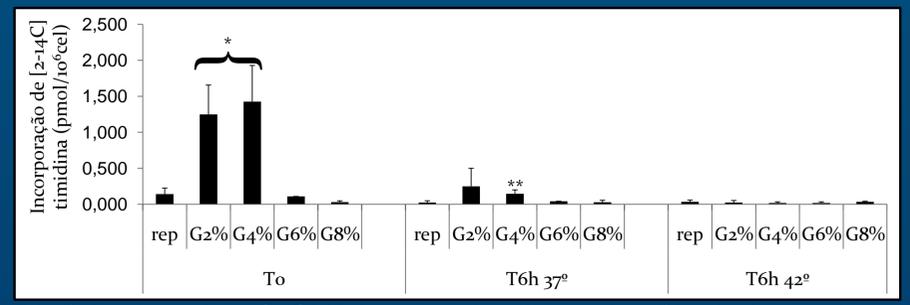


Fig6: gráfico ilustrando as quantidades de [2-14C] timidina incorporada pelas células retiradas logo após o sacrifício e após as 6h de cultura pós banho-maria (CTRL - 37°C, ou HS - 42°C). Resultado expresso em pmol/10⁶ cel. Dados expressos em média ± erro padrão analisados por ANOVA de uma via, Student Neuman Keuls, p<0,05, SPSS v.13.0. * diferença significativa em relação aos outros grupos. ** Diferença significativa em relação aos grupos rep, G6% e G8%.

Conclusão

- Animais treinados apresentam, em resposta ao choque térmico, expressão mRNA de HSP70 proporcional à intensidade de exercício, embora expressem a menor quantidade basal de mRNA de ambos os tipos de (HSP72), tanto imediatamente após o choque quanto após as 6h de cultura (HSP73).
- Treinamento de alta intensidade causa aumento na quantidade de HSP70 exportada durante um evento de choque térmico, que persiste por horas após o evento.
- Animais treinados a intensidades moderadas apresentaram maior proliferação das celular
- Esses dados pode-se inferir que a HSP70 pode ser utilizada como um marcador de estresse celular decorrente de altas intensidades de treinamento físico.