

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70)  
ligam-se à insulina na circulação sanguínea  
modulando a disponibilidade de glicose circulante

**Mirna Stela Ludwig**

Porto Alegre  
2013

**Mirna Stela Ludwig**

**Proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70)  
ligam-se à insulina na circulação sanguínea  
modulando a disponibilidade de glicose circulante**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial  
para a obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Orientador: Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.

Porto Alegre  
2013

# Dedicatória

---

*Fazer o doutorado foi a obra do possível.*

*Querer fazê-lo foi transformar o possível em realidade.*

*Dedico este trabalho a todos que contribuíram para torná-lo fato.*

# AGRADECIMENTOS

---

O desenvolvimento das investigações descritas neste trabalho de pesquisa contou com a colaboração de diversos centros de pesquisa e com o apoio incondicional de vários colegas.

Aos colaboradores do Laboratório 32 do Departamento de Bioquímica, em especial ao Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira e ao Marcelo Sartori Grunwald, pelo trabalho de modelagem molecular da interação entre HSP70 e insulina, que contou com o apoio do Centro Nacional de Supercomputação da UFRGS integrado ao Sistema Nacional de Processamento de Alto Desempenho (SINAPAD).

Ao apoio do Laboratório de Obesidades e Diabetes da Universidade Estadual de Maringá, dirigido pelo Prof. Roberto Barbosa Bazotte, onde alguns experimentos de hipoglicemia foram realizados para coleta de amostras de plasmas e tecidos para posterior análise em nosso laboratório. Em particular, agradecemos à colega Vania Cibele Minguetti que participou de vários experimentos sob a orientação do Prof. Bazotte.

Aos colaboradores do Laboratório de Fisiologia Celular, no desenvolvimento dos experimentos de captação de glicose *in vitro* e *in vivo*, imunodeteções e medidas de radioatividade dos tecidos com substâncias radiomarcadas: Maciel Alencar Bruxel, Rossana Rosa Porto, Aline Bittencourt, Bolívar Bertoldo Bandeira, Sofia Pizzato Scomazzon, Helena Trevisan Schroeder, Patricia Martins Bock, Cinthia Maria Schöler, Victor de Souza Borges e Mauricio da Silva Krause, e por músculo isolado em incubações curtas: Rossana Rosa Porto, Patrícia Renck Nunes, Bolívar Bertoldo Bandeira e Ana Lúcia Hoefel.

Aos Professores Rui Curi (USP) e Philip Newsholme (Curtin University), pelas discussões e sugestões durante o desenho experimental e execução dos experimentos.

Aos colaboradores do Laboratório de Ensaio Biológicos da UNIJUI: Thiago Gomes Heck, Analu Bender dos Santos, Bethânia Salamoni, Eloisa Gabriela de Pelegrin Basso, Fernanda Giesel Baldissera, Iberê Machado Kostrycky, Maciel Alencar Bruxel, Maicon Machado Sulzbacher e Pauline Brendler Goettems, pelo apoio no desenvolvimento das etapas de tratamento dos animais, obtenção de material biológico e análises realizadas.

### **Agradecimentos especiais:**

A Deus, pela fé.

Aos meus filhos, Bernardo e Maria Augusta, pelo sentido da vida, pelo amor e imensurável compreensão.

Ao meu esposo, Remi, pelo amor, incansável atenção e apoio incondicional.

Aos meus pais, Beno e Terezinha, pela vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Ivo, por acreditar em mim e pelos seus admiráveis e importantes ensinamentos.

Aos meus alunos, Pauline, Maciel, Bethânia e Maicon por toda dedicação, amizade e grande ajuda.

Ao meu grande amigo e colega, Thiago, pelos ensinamentos, pela colaboração, amizade e incansável animação.

Aos meus grandes amigos, Martinho, Mara e Cátia, pela permanente vigília e grandes alegrias.

Aos grandes amigos, por fazerem a vida colorida.

Aos amigos e colegas do GPeF, pelas conquistas, pela valiosa contribuição e amizade.

Aos colegas de trabalho, pela compreensão e apoio.

Aos colegas do FISCEL, pelo apoio e amizade.

A UNIJUI, por meio do Departamento de Ciências da Vida, pelo apoio.

Ao PPG- Fisiologia, pela oportunidade.

**OBRIGADO!**

# FONTES DE FINANCIAMENTO

---

Os estudos aqui apresentados foram financiados com recursos públicos provenientes dos seguintes editais do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): MCT/ CNPq/ CT-Bio/ CT-Saúde/ MS/ SCTIE/ DECIT (processos nº 551097/2007-8 e nº 563870/2010-9) e Ciência sem Fronteiras (processos nº 402364/2012-0 e 402626/2012-5). Os trabalhos contaram ainda com apoio financeiro do Instituto Nacional de Hormônios e Saúde da Mulher (coordenadora Profa. Poli Mara Spritzer) e das Pró-Reitorias de Planejamento (PROPLAN), de Pós-Graduação (PROPG, Programa CAPES-PROAP) e de Pesquisa (PROPESQ) da UFRGS.

De tudo ficaram três coisas...  
A certeza de que estamos começando...  
A certeza de que é preciso continuar...  
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...  
Façamos da interrupção um caminho novo...  
Da queda, um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro!  
*(Fernando Sabino)*

# Sumário

---

Dedicatória .....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
FONTES DE FINANCIAMENTO.....	vi
Lista de Figuras e Tabela .....	xii
Lista de abreviações .....	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT .....	xvii
INTRODUÇÃO.....	1
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO: CARACTERIZAÇÃO .....	1
HSP70 INTRACELULAR: SUAS IMPLICAÇÕES NA GLICEMIA .....	6
HSP EXTRACELULAR: AÇÕES E REGULAÇÃO DA SECREÇÃO POR FATORES METABÓLICOS.....	10
INSULINA: CARACTERIZAÇÃO, AÇÕES, EFEITOS E RESISTÊNCIA.....	14
POSSIBILIDADE DE INTERAÇÃO ENTRE AS VIA DAS HSP70 E DA RESPOSTA À INSULINA: QUESTÕES A SEREM RESPONDIDAS.....	17
OBJETIVOS .....	21
OBJETIVO GERAL:.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	21
MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	22
CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	22
CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL .....	23
SEGURANÇA PROCEDIMENTAL.....	23
ANIMAIS.....	24



PROCOLO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE PLASMA PARA EXPERIMENTOS DE COIMUNOPRECIPITAÇÃO DE INSULINA - HSP70 e DOSAGEM DE GLICOSE, INSULINA E HSP70 .....	25
PROCOLO PARA EXPERIMENTOS DE CHOQUE TÉRMICO.....	26
TESTES DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E À INSULINA .....	30
PROCOLO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA CAPTAÇÃO DE 2-DESÓXI-GLICOSE RADIOMARCADA.....	34
MORTE DOS ANIMAIS .....	39
PLASMA e ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	40
COLETA DOS TECIDOS .....	41
COIMUNOPRECIPITAÇÃO HSP-INSULINA .....	42
INTERAÇÃO TEÓRICA DA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70 (HSP70) COM INSULINA.....	45
CÁLCULOS E EQUAÇÕES .....	47
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	53
HIPÓTESES, PREDIÇÕES E RESULTADOS .....	55
HIPÓTESE 1: HSP70 funciona como <i>chaperona</i> extracelular ligando-se à insulina.....	55
PREDIÇÃO 1A: A HSP70 extracelular deve ligar-se à insulina com alta afinidade em simulações matemáticas.....	55
PREDIÇÃO 1B: Se os resultados <i>in silico</i> são verdadeiros, HSP70 extracelular deve ligar-se <i>in vivo</i> à insulina e coimunoprecipitar com a mesma no plasma .....	60
HIPÓTESE 2: A ligação de HSP70 com a insulina indisponibiliza o hormônio para ligação a seus receptores <i>in vivo</i> provocando aumento na oferta de glicose para o plasma .....	70
PREDIÇÃO 2A: O choque térmico deve elevar a concentração de eHSP70 circulante e assim, promover alteração na resposta glicêmica. ....	70

PREDIÇÃO 2B: A administração de anticorpo anti-HSP70 deve abolir o efeito hiperglicemiante do choque térmico no tempo experimental de 12 horas pós-choque. ...	83
PREDIÇÃO 2C: Se os efeitos do choque térmico dependem da síntese <i>de novo</i> de moléculas de HSP70, então, a administração de quercetina antes do choque deve suprimir o efeito hiperglicemiante do choque térmico. ....	85
PREDIÇÃO 2D: Se a concentração de ácidos graxos livres (AGL) estiver maior na situação de 12 horas após choque térmico, poderia explicar o porquê do aumento de concentração de glicose circulante. ....	87
HIPÓTESE 3: Se HSP70 causa maior disponibilidade de glicose na circulação, é possível que existam tecidos <i>in vivo</i> captando menos glicose diante de uma sobrecarga glicêmica, mesmo na presença de insulina circulante. ....	89
PREDIÇÃO 3A: A captação de 2-desóxi-glicose (2DG-[ <sup>3</sup> H]) deve ser menor em tecidos-chave, como o tecido adiposo e o músculo esquelético, 12 horas após o choque térmico, quando comparado aos respectivos controles.....	89
PREDIÇÃO 3B: A administração de HSP70 exógena deve reduzir a captação de 2-desóxi-glicose (2-DG) em tecidos-chave, como o tecido adiposo e o músculo esquelético, assemelhando-se à resposta obtida pela exposição ao choque térmico, sugerindo, assim, que a HSP72 extracelular esteja envolvida na redução da captação de glicose. ....	95
PREDIÇÃO 3C: Se a HSP72 (ou o choque térmico) está provocando alteração na tolerância à glicose por uma ação independente de insulina sobre o músculo, então, a HSP72 não deve influir na captação de 2-DG [ <sup>14</sup> C] por músculo solear isolado, incubado na presença ou ausência de insulina. ....	98
DISCUSSÃO .....	101
CONCLUSÃO .....	115
PERSPECTIVAS .....	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	117
MATERIAL COMPLEMENTAR .....	xiv
DOCUMENTO COMPROBATÓRIO DA SUBMISSÃO DO ARTIGO: .....	xiv

CÓPIA DO ARQUIVO ELETRÔNICO DO ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO..... xv

# Lista de Figuras e Tabela

---

Figura 1. Representação esquematizada dos grupos e tempos experimentais de ensaios <i>in vivo</i> .....	28
Tabela 01: Representação esquemática de ensaios para imunoprecipitação.....	43
Figura 2. Cálculos relativos aos pesos moleculares dos ensaios de coimunoprecipitação de insulina biotinizada e HSP70. ....	47
Figura 3. Representação esquemática das formas geométricas, base para os cálculos da área incremental sob a curva .....	49
Figura 4. Representação ilustrativa da aplicação equacional no trapézio para os cálculos da área incremental sob a curva. ....	50
Figura 5. Modelagem molecular da interação entre HSPA1A e insulina. ....	57
Figura 6. Simulação de dinâmica molecular para o acoplamento entre a HSPA1A e a insulina.....	58
Figura 7. Diagramas de interação proteína-proteína entre HSPA1A e insulina.....	59
Figura 8. Coimunoprecipitação de HSP70 utilizando-se anticorpo anti-insulina em amostras de plasmas. ....	61
Figura 9. Concentração plasmática de glicose, insulina e HSP72 em amostras de plasma. ....	63
Figura 10. Coimunoprecipitação de HSP70 utilizando-se anticorpo anti-insulina e insulina.....	65
Figura 11. Coimunoprecipitação de insulina utilizando-se anticorpo anti-HSP70.....	66
Figura 12. Coimunoprecipitação competitiva de insulina biotinizada com HSP70 e cálculos relativos à constante de dissociação (Kd) da ligação entre insulina e HSP70. ....	69
Figura 13. Testes de tolerância à glicose realizados nos tempos experimentais de 06, 12 e 24 horas pós-choque térmico.....	73
Figura 14. Área incremental sob a curva dos testes de tolerância à glicose. ....	74

Figura 15. Concentração plasmática de eHSP72, eHSP73 e eHSP70 total, em diferentes tempos experimentais pós-choque térmico .....	77
Figura 16. Concentração plasmática de insulina durante GTT 12 h pós-choque.....	78
Figura 17. Testes de tolerância à insulina realizados nos tempos experimentais de 06, 12 e 24 horas pós-choque térmico.....	80
Figura 18. Concentração de insulina plasmática em diferentes tempos experimentais pós-choque térmico.....	81
Figura 19. HOMA-IR. ....	82
Figura 20. Teste de tolerância à glicose realizado no tempo experimental 12 horas pós-choque térmico, com e sem anticorpo anti-HSP70.....	84
Figura 21. Teste de tolerância à glicose em animais tratados com quercetina.....	86
Figura 22. Concentração de ácidos graxos livres no plasma, em diferentes tempos experimentais pós-choque térmico .....	88
Figura 23. Captação de glicose ( $\mu\text{mol}/100\text{ g de peso}$ ) por tecidos de animais expostos ao choque térmico.....	92
Figura 24. Captação de 2-DG ( $\mu\text{mol}/\text{g tecido}$ ) por tecidos de animais expostos ao choque térmico.....	94
Figura 26. Captação de glicose por tecidos de animais que receberam HSP70-A1 de modo que as concentrações plasmáticas atingissem $1\text{ ng/mL}$ .....	97
Figura 27. Captação de glicose em experimentos de incubação com músculo solear isolado.....	99
Figura 28. Captação de glicose em experimentos de incubação com músculo solear isolado em várias condições experimentais.....	100

# Lista de abreviações

---

2-DG.....	2-Desóxi-glicose
AC.....	Anticorpo
ACTH.....	Hormônio adrenocorticotrópico
AGL.....	Ácido graxo livre
Akt.....	Proteína Quinase B
Akt2.....	Isoforma 2 Proteína Quinase B
AMPK .....	Proteína Quinase Ativada por AMP
COX.....	Ciclo-oxigenase
CRH.....	Hormônio liberador de corticotrofina
EDTA.....	Ácido Etilenodiaminotetra-acético
eHSP70 .....	HSP70 Extracelular
ELISA .....	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FisCel.....	Laboratório de Fisiologia Celular
GLUT4 .....	Transportador De Glicose-4
GSK3.....	Glicogênio Quinase Sintase
HOMA-β.....	Modelo de Avaliação da Homeostase ao Funcionamento da Célula β
HOMA-IR.....	Modelo de Avaliação da Homeostase a Resistência Insulínica
HSE .....	Elemento Regulador de Choque Térmico
HSF .....	Fator de Choque Térmico
HSPs .....	Proteínas de Choque Térmico
HSR .....	Heat Shock Response
IAUC.....	Área Incremental Sob a Curva
iHSP70 .....	HSP70 Intracelular
IKK .....	Proteína quinase do Inibidor do Fator Nuclear κB
IL-1.....	Interleucina 1
IL-6.....	Interleucina 6
IPGTT.....	Teste de Tolerância à Glicose via Intraperitoneal
IPITT.....	Teste de Tolerância à Insulina via Intraperitoneal
IRS1 .....	Substrato 1 Do Receptor De Insulina
IRS2 .....	Substrato 2 Do Receptor De Insulina
JNK .....	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
LEBio.....	Laboratório de Ensaios Biológicos
MAPK.....	Proteína Quinase Ativada Por Mitógenos
NEFs.....	Fator Trocador de Nucleotídeos
NF-κB.....	Fator Nuclear κB
PBD.....	Domínio de Ligação de Peptídeo
PBS.....	Tampão Salina tamponada com fosfato

PDB.....Banco de dados de proteínas do  
RCSB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank)  
PI3K .....Fosfatidilinositol-3-Quinase  
PKC .....Proteína Quinase c  
PMSF ..... Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila  
TNF- $\alpha$ .....Fator de Necrose Tumoral Alfa  
TRLs ..... Receptores do tipo Toll (do inglês, *Toll-like Receptors*)

# RESUMO

---

**Proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) ligam-se à insulina na circulação sanguínea modulando disponibilidade de glicose circulante.** Situações de estresse metabólico e térmico deflagram a expressão celular e liberação para o plasma, de proteínas de choque térmico da família de 70 kDa (HSP70) para desempenhar função de defesa-chave em um processo conhecido como resposta ao choque térmico ou ao estresse, que as caracterizam como proteína citoprotetora. Estudos indicam a ocorrência de HSP70 extracelular (eHSP70) na circulação por até 24 h após desafios como o exercício físico, cuja liberação dá-se por tecidos do território hepatoesplâncnico, em uma resposta mediada por receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. Esta liberação de HSP70 para o plasma é atenuada pela ingestão de glicose. Estas evidências levaram-nos a supor que a liberação de eHSP70 em resposta ao estresse possa ter um papel fisiológico na regulação da glicemia, a qual é afetada por estímulo simpático. Neste trabalho, os resultados dos experimentos *in silico* indicaram a possibilidade de ancoragem e interação estável entre a HSP70 e a molécula de insulina. Ensaio de imunoprecipitação de insulina com amostras de plasma de animais submetidos ao tratamento de insulina Regular e Detemir revelaram HSP70 coimunoprecipitada especialmente em situação de jejum severo. Parte destas amostras foi submetida à quantificação de glicemia, insulinemia e HSP72 circulante, cujos resultados evidenciam elevada concentração desta proteína de choque térmico por ocasião de hipoglicemia induzida por insulina. Parte dos estudos *in vivo* deste trabalho foram desenvolvidos com ratos submetidos ao choque térmico agudo (uma sessão de 15 minutos) com hipertermia induzida (41,5 °C) ou com injeção de HSP70 (HSPA1A) exógena, com grupos experimentais organizados em grupos Controle (C) e Choque Térmico (HS) e, em tempos experimentais: imediatamente (tempo zero), 6, 12 e 24 h pós-choque. Foi observada a ocorrência das formas constitutiva e induzível de eHSP70 no plasma de animais submetidos ao choque térmico com valor maior nos períodos de 12 e 24 h pós-choque. Nossos estudos mostram que, *in vivo*, a eHSP70 plasmática produz alteração na tolerância à glicose, com maior hiperglicemia, quando o teste é realizado 12 h após o choque térmico. Este efeito foi bloqueado pela administração (i.p.) de anticorpo anti-HSP70 e se mostrou independente da síntese *de novo* de HSP70. Ainda, a presença de eHSP70 plasmática (induzida por choque térmico ou administrada via endovenosa) causa menor captação de glicose pelo músculo esquelético. Ensaio com músculo isolado indicam que o efeito inibidor da eHSP70 sobre a captação de glicose é dependente de insulina. Apesar das evidências de que a ligação HSP70-insulina no plasma tenha implicação sobre a oferta de glicose, não se pode descartar também a possibilidade de que as ações da eHSP70 estejam ocorrendo pela sua ligação a receptores específicos, e/ou de que sejam parte de uma resposta ao estresse na qual estejam implicados os hormônios contrarregulatórios. Em suma, os resultados indicam que a eHSP70 plasmática é capaz de se ligar- à insulina, provocar tolerância alterada à glicose e diminuir a captação de glicose pelo músculo esquelético, aumentando a disponibilidade de glicose circulante.



# ABSTRACT

---

**Extracellular 70 kDa heat shock protein binds insulin in the circulation and regulates plasma glucose availability.** Metabolically stressful situations trigger the expression and release of the 70 kDa (HSP70) as an essential protective response, in a process known as heat shock (HS) response or stress response. HSP70 is characterized as cytoprotector entities. Previous studies indicate the occurrence of extracellular HSP70 (eHSP70) in the circulation up to 24 h after stressful challenges, such as physical exercise, and that such eHSP70 liberation comes from hepatosplanchnic tissues, in an  $\alpha_1$ -adrenergic dependent response, which is attenuated by glucose ingestion. The above findings led us to suppose that stress-elicited eHSP70 release could play a physiological role on glycemic control, which are affected by sympathetic stimuli. In this work, *in silico* experiments indicated the possibility of docking and stable interaction between HSP70 and the insulin molecule. Immunoprecipitation of plasma samples revealed that HSP70 co-immunoprecipitates with insulin, especially under severe fast. Part of these samples was subjected to quantification of glucose, insulin and circulating HSP72, whose results show high concentration of heat shock protein during severe hypoglycemia induced by insulin. Part of the *in vivo* studies from this work were also carried out in healthy rats submitted to an acute (15 min) HS (41.5 °C) session or in HSP70 (HSPA1A)-injected rats, assigned into control (C) and HS groups which were observed immediately and after 6, 12 and 24 h post-shock. Both the constitutive (predominantly) and the inducible forms of eHSP70 were observed in the plasma of heat shocked animals, being the times 12 and 24 h those in which the highest concentrations were noted. Our studies suggest that *in vivo* produces eHSP70 change in plasma glucose tolerance, greater hyperglycemia when glucose tolerance test is performed 12 h after heat shock, and this effect was abrogated by anti-HSP70 antibody administration (i.p.) and independent of *de novo* synthesis of HSP70. Moreover, the presence of eHSP70 (HS-induced or injected) in the plasma or in soleus muscle incubations elicits lower glucose uptake from the skeletal muscle. Isolated muscle studies indicate that eHSP70 inhibiting effect over glucose uptake is insulin-dependent. However, although evidence suggests a role for HSP70 binding to insulin over glucose offering, it cannot be discarded the possibility that eHSP70 actions are due to their binding to specific HSP70 membrane receptors within the muscle cell, and/or that are part of a stress response in which the counter-regulatory hormone are involved. In short, the results indicate that eHSP70 plasma is able to bind to insulin, causing impaired glucose tolerance and decrease glucose uptake by skeletal muscle, increasing blood glucose availability.

# INTRODUÇÃO

---

## PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO: CARACTERIZAÇÃO

A evolução do organismo unicelular para o pluricelular, a especialização de grupos celulares e a transição da vida na água para a vida na terra aumentaram de forma notável a sobrevivência, o raio de ação e a independência dos seres vivos. De outro lado, a manutenção de determinadas estruturas (proteínas, por exemplo) e sistemas regulatórios revela sua importância no curso do processo evolutivo.

Os organismos vivos respondem aos desafios como o choque térmico e outras situações de estresse de diferentes origens, pelo aumento da expressão dos genes das proteínas de choque térmico- HSP (do inglês *Heat Shock Protein*) ou proteínas do estresse. Estas proteínas de choque térmico são exemplos de estruturas conservadas durante a evolução das espécies, das bactérias ao ser humano (MORIMOTO et al.,1990).

A primeira demonstração da indução celular destas proteínas, em resposta ao estresse térmico, foi relatada em 1962 por Ferruccio Ritossa ao estudar glândulas salivares de *Drosophila busckii*. O estabelecimento do termo “proteínas de choque térmico” ocorreu somente em 1974. O processo pelo qual as células respondiam ao estresse ficou conhecido como *Heat Shock Response* (HSR) ou resposta ao choque térmico ou, ainda, resposta ao estresse (DE MAIO et al., 2012).

A regulação transcricional da resposta ao choque térmico é mediada por ativador transcricional pré-existente, o fator de choque térmico (HSF), que se liga ao seu elemento regulador de choque térmico (HSE) presente em todos os genes promotores. A arquitetura das moléculas de HSF foi marcadamente conservada durante a evolução e, quando as estruturas das isoformas de HSFs são comparadas em vertebrados de uma mesma espécie, a sequência de aminoácidos é idêntica em pelo menos 40%, e, quando

comparados entre espécies, a homologia pode ser de até 92%. Portanto, trata-se de sistema de regulação de transcrição gênica altamente conservado entre as espécies (OROSZ & BENJAMIN, 2007).

Em mamíferos, os HSFs são coexpressos, negativamente regulados e ativados sob condições ambientais e eventos fisiológicos específicos. Os fatores HSF1 e HSF3 funcionam como ativadores responsivos ao estresse, e ambos são necessários para a resposta máxima ao choque térmico, enquanto o HSF2 é ativado durante a diferenciação e desenvolvimento embrionário. O HSF1 e o HSF2 são encontrados em todas as células, e o HSF4 parece ser específico a algumas células como neurônios, células do músculo cardíaco e esquelético, além de apresentar características repressoras da resposta ao choque térmico, sendo um regulador negativo (NAKAI et al., 1997).

Mesmo se compreendendo o fato de que os HSFs são importantes na homeostasia celular, muito ainda se discute sobre qual a razão para a existência de múltiplos HSFs. Uma possibilidade investigada é que organismos mais complexos poderiam utilizar múltiplos HSFs para responder aos mais diversos desafios fisiológicos, e, portanto, vencer o processo evolutivo enfrentando as adversidades ambientais (SANTORO, 2000).

Em condições normais, o HSF está presente na célula na forma latente de monômero, e se liga ao DNA com baixa afinidade. Entretanto, sob condições de choque térmico ou outros estímulos estressores, o HSF é reversivelmente convertido ao estado trimérico, e adquire alta afinidade pelo DNA (OROSZ & BENJAMIN, 2007). Sua atividade é reprimida pela interação com HSP90, HSP70 e HSP40, assim como pela fosforilação nos resíduos Ser303 e Ser307. Em resposta ao estresse proteotóxico, a HSP90 liga-se a proteínas desdobradas, e dissocia-se do HSF1, que assume a forma de trímero e se dirige ao núcleo da célula para se ligar ao HSE presente nos promotores dos genes responsivos ao estresse, deste modo aumentando a expressão gênica da proteína de choque térmico.

A expressão de HSP72 requer a ativação do HSF1, o que não acontece com a forma constitutiva da HSP70, cuja expressão acontece inclusive em animais nocaute para o HSF1 (WHITESELL & LINDQUIST, 2009). A repressão do HSF1 pode ocorrer por vias que

são mediadas pela fosforilação, incluindo a dupla fosforilação nos resíduos Ser307 e Ser303 pela via da ERK (quinase regulada extracelularmente) e GSK3 (quinase glicogênio sintase), e fosforilação da Ser363 pela proteína quinase C (PKC)(ASEA & DE MAIO, 2007).

A classificação das proteínas de choque térmico baseia-se no seu peso molecular, e estabelece distintas famílias, incluindo a HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, e pequenas HSP, nas quais pode haver especificações. Em virtude da frequente confusão gerada pela expansão do número de membros conhecidos nas várias famílias de proteínas de choque térmico e à inconsistência em sua nomenclatura, foi proposto um conjunto de diretrizes para a nomenclatura destas famílias, com a seguinte denominação: HSPH (HSP110), HSPC (HSP90), HSPA (HSP70), DNAJ (HSP40) e HSPB (pequenas HSP); famílias da *chaperoninas*, HSPD/E (HSP60/HSP10) e CCT (TRiC) (HAGEMAN *et al.*, 2011).

As proteínas de 70 kD são codificadas por multigenes e encontradas em distintos compartimentos celulares. Incluem-se a forma mitocondrial de 75 kDa (P75), a forma glicose-regulada de 78 kDa (BiP/ GRP 78), encontrada no retículo endoplasmático, a forma constitutivamente expressa de 73 kDa (HSC70 ou HSP73) e a forma induzível de 72 kDa (HSP70 ou HSP72) (SANTORO, 2000).

Em nossa investigação, abordamos a proteína de 70 kDa que, dentre todas as famílias, é a mais conservada filogeneticamente, cuja estrutura no homem é 72% homóloga em relação às drosófilas (*Drosophila sp.*). Além disso, é uma proteína de importante expressão celular (pode representar até 5% do total de proteínas intracelulares) (SANTORO, 2000) e, também, de ocorrência extracelular (POCKLEY *et al.*, 1998).

De maneira geral, utiliza-se o termo unificado 'HSP70' abrangendo as duas principais formas, constitutiva (ou cognata, HSC70 ou HSP73) e induzível (HSP72). Ao longo deste texto, será usado o termo HSP70 como um coletivo de proteínas de choque térmico, abrangendo tanto a forma constitutiva como a induzível, quando não houver necessidade de distinção e, quando houver, serão denominadas, respectivamente, de HSP73 (HSPA8) e HSP72 (HSPA1A e HSPA1B).

Os membros da família da proteína citoplasmática de choque térmico de 70 kDa estão envolvidos na dobragem adequada e transporte de proteínas recentemente

sintetizadas na célula. Estudos indicam que as formas constitutiva e induzível (HSP72) são altamente relacionadas, com semelhanças funcionais, interagindo entre si de uma maneira dependente de ATP, e exibem localização coincidente dentro da célula (BROWN *et al.*, 1993). A HSP73, expressa constitutivamente, e HSP72, cuja expressão é induzida pelo choque térmico e outras formas de estresse celular, são frequentemente consideradas como tendo funções celulares semelhantes, mas existem indicativos de que as funções intracelulares destas proteínas homólogas, mas não idênticas, possam ser diferentes ou ser dependentes da concentração (GOLDFARB *et al.*, 2005).

Diferenças na função entre formas de HSP70 citossólica podem refletir diferenças na localização celular antes e após o estresse. A HSP72 não é usualmente detectada em células de roedores antes do estresse, mas, em humanos, apresenta expressão basal, além de ser fortemente induzida pelo estresse. Outros trabalhos mostram que a HSP72 e a HSP73 apresentam 95% da sua sequência idêntica, e que ambas são encontradas no citossol e no núcleo da célula, com predominância no núcleo durante e logo após o estresse. Alguns estudos reportam que estas proteínas (HSP72/73) também se localizam na membrana de algumas células após o choque térmico. Em células não estressadas, HSP72 e 73 podem estar associadas com proteínas distintas mas, durante o estresse, ambas são mobilizadas para proteger os sítios essenciais (ELLIS *et. al.*, 2000).

A estrutura da HSP70 pode ser dividida em:

- um domínio (amino)NH<sub>2</sub>-Terminal ATPase (AD), de ~45kDa;
- um domínio de ligação de peptídeo (PBD) de ~15kDa e
- um domínio (carbóxi) COOH-terminal de ~10kDa (CALDERWOOD *et al.*, 2007).

O domínio N-Terminal ATPase é membro de uma família antiga de proteínas quinase bilobulares versáteis, incluindo-se a actina e a hexoquinase. A relação comum estrutura-função em todos os membros da família é dependente de ATP, com o fechamento e abertura (hidrólise-dependente) dos dois lobos. No caso da HSP70, a ligação do ATP também provoca a abertura do PBD, e a hidrólise do ATP promove o fechamento da PBD. A porção PBD é menos conservada do que a AD, e inclui subdomínios que podem ter função distinta (LANDRY, 2007).

A função intracelular mais conhecida da HSP70 é a função *chaperona*<sup>1</sup>, realizada em ciclos de ligação-liberação do substrato que é regulado pela hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP). Na presença de ATP, a HSP70 liga-se fracamente ao peptídeo, e abre o domínio C-terminal. Sob estimulação da *cochaperona* HSP40, o ATP é hidrolisado (formando ADP), e o domínio C-terminal se fecha trancando/bloqueando o peptídeo/substrato na HSP70 em uma forte ligação. Os fatores de trocas de nucleotídeos (NEFs) liberam o difosfato de adenosina para permitir a ligação do ATP. Com o ATP ligado, abre-se o domínio C-terminal, e o peptídeo é liberado (ASEA & CALDERWOOD, 2007).

Apesar dos pesos moleculares similares, as HSPs apresentam padrões de indução e de expressão distintos. Assim, embora constitutivamente expressa, a síntese de HSP70 pode ser induzida por uma grande variedade de fatores estressores, entre eles o choque térmico, alterações no estado redox, exposição a metais pesados, radiação UV, análogos de aminoácidos, infecção por bactérias ou por parasitas, inflamação, drogas citostáticas, inibidores da COX (ciclo-oxigenase), ácido acetilsalicílico e privação de glicose (HENDERSON, 2010).

Quanto à indução da expressão de HSP70 por choque térmico, esta parece depender da temperatura em que os organismos crescem. Em drosófilas, por exemplo, que crescem a 25°C, as HSPs são induzidas quando a temperatura aumenta para 29-38°C, mas a resposta máxima é observada à temperatura 36-37°C. Em organismos que crescem em uma faixa mais restrita de variação de temperatura, a resposta máxima ocorre em torno de 5°C acima da temperatura ótima (LINDQUIST, 1986).

Em resposta ao choque térmico *in vitro* ou *in vivo*, ocorre aumento no conteúdo intracelular e também extracelular desta proteína, representando diferentes situações a seguir descritas.

---

<sup>1</sup> *Chaperona*, Termo derivado do inglês *chaperon*, que significa acompanhante molecular, em virtude da sua capacidade de impedir a agregação de proteínas intracelulares, auxiliar no remodelamento e manutenção de proteínas estruturais, na translocação de proteínas, na degradação de proteínas instáveis e no remodelamento de proteínas desnaturadas. Em não havendo uma tradução mais adequada, será usado no texto o termo "*chaperona*".

## HSP70 INTRACELULAR: SUAS IMPLICAÇÕES NA GLICEMIA

As HSP70 são proteínas cuja função primária no ambiente celular é atuar como *chaperona* molecular, participando, deste modo, em uma grande variedade de processos celulares, incluindo o dobramento de novas proteínas, a prevenção da agregação proteica, o redobramento de proteínas, a translocação de proteínas através de membranas de organelas e a associação e dissociação de complexos proteicos.

Ao considerarmos que a concentração intracelular de proteínas pode chegar a 300 mg/mL, não surpreende a necessidade de proteínas *chaperonas* para promover o seu correto dobramento. No ambiente celular, HSP70 e a *co-chaperona* HSP40 previnem a agregação proteica, e catalisam o dobramento de polipeptídeos, pois elas se ligam à parte hidrofóbica das proteínas desdobradas ou não dobradas. Como já descrito anteriormente, a função das HSP70 pode ser regulada por padrões específicos de HSP40 e por fatores de trocas de nucleotídeos (NEFs) (ASEA & CALDERWOOD, 2007).

Em termos de sobrevivência da célula, as propriedades da família de HSPs permitem que as células respondam a desafios ao reconhecerem proteínas danificadas, canalizando-as para o reparo/dobramento ou para a proteólise. Ainda, estão implicadas como inibidores da programação de morte celular, e bloqueiam tanto as vias intrínsecas como as extrínsecas de caspases. Além disso, podem modular a inflamação da célula, e promover a cicatrização de tecidos lesados. (ATALAY *et al.*, 2009; HECK, 2011). Pode-se, portanto, considerar que a indução da expressão HSP70, com consequente elevação do conteúdo intracelular desta proteína, representa um potencial fator citoprotetor e, por extensão, protetor do organismo. Células que sintetizaram HSP em resposta à exposição ao estresse, encontram-se mais protegidas contra novas exposições (MEYER, 1999).

A expressão intracelular de HSP70 (iHSP70) está associada a mecanismos antiapoptóticos e ações anti-inflamatórias. A ação anti-inflamatória da HSP70 reside especialmente no seu efeito inibitório sobre a ativação e translocação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (2007; HECK, 2011), que produz profundas implicações no sistema imunológico, em processos inflamatórios e em fatores reguladores da sobrevivência celular e da apoptose (RAN *et al.*, 2004).

O fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B refere-se a uma família de fatores de transcrição críticos para a regulação da proliferação e sobrevivência durante a resposta imune, inflamatória e ao estresse. Em células em repouso, o NF- $\kappa$ B encontra-se inativo no citoplasma, cuja forma predominante é um heterodímero composto pelas subunidades p50 e RelA, ligadas a proteínas inibitórias da família I $\kappa$ B, incluindo as proteínas I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\gamma$ . A interação com proteínas I $\kappa$ B mantém o fator de transcrição no citoplasma, impedindo sua ação (PIVA *et al.*, 2006).

A ativação do complexo NF- $\kappa$ B dá-se em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo infecção bacteriana e viral, exposição à citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e agentes indutores de estresse, incluindo espécie ativas de oxigênio. A ativação deste fator de transcrição decorre da fosforilação, pelas I $\kappa$ B quinases (IKK) e degradação do I $\kappa$ B (nos proteossomos). Livres do I $\kappa$ B, os dímeros de NF- $\kappa$ B migram para o núcleo onde se associam aos elementos de ligação  $\kappa$ B presentes nos promotores de virtualmente todas as proteínas induzíveis, responsáveis pelo disparo da inflamação ou de respostas imunológicas (CURI & HOMEM de BITTENCOURT, 2001).

O mecanismo pelo qual a resposta ao choque térmico (HSR) inibe a ativação do NF- $\kappa$ B pode estar associado à preservação do I $\kappa$ B $\alpha$ , à diminuição da fosforilação do promotor da I $\kappa$ B $\alpha$ , e está correlacionado à inibição da atividade da I $\kappa$ B quinase (IKK). Outro mecanismo potencial é que a HSR ativa o promotor da I $\kappa$ B- $\alpha$ , e aumenta a transcrição do RNA de I $\kappa$ B- $\alpha$ . Além disso, a HSR pode inibir a translocação do NF- $\kappa$ B ao núcleo e à degradação do I $\kappa$ B. Dados também demonstram que a HSP70 suprime a ativação e translocação nuclear do NF- $\kappa$ B via aumento da atividade da fosfatase intracelular. A atividade de IKK é contrabalançada pela atividade da fosfatase



intracelular, pois a inibição desta enzima leva à degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  (ASEA e CALDERWOOD, 2007).

Muitos estudos buscam entender a complexa relação entre o NF- $\kappa$ B, as proteínas de choque térmico e o HSF-1. O NF- $\kappa$ B tem efeitos pró-inflamatórios ao induzir a expressão de citocinas inflamatórias; a ativação da resposta ao choque térmico deflagra a ativação do HSF-1, que inibe a transcrição de genes pró-inflamatórios e modula a ativação do NF- $\kappa$ B, além de ativar a expressão de HSP70. A HSP70, por sua vez, inibe a ativação do NF- $\kappa$ B, além de produzir efeito anti-inflamatório direto (KNOWLTON, 2006).

Neste contexto, entendemos pertinente considerar a resistência periférica à insulina, visto ser uma condição fisiopatológica desencadeada por processo inflamatório crônico, principalmente em pacientes obesos. Neste sentido, não se pode descartar a possibilidade de que defeitos na expressão de HSP70 possam estar relacionados ao desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 e obesidade. De fato, vários estudos realizados com modelos experimentais e humanos com resistência insulínica demonstram que o aumento da concentração intracelular da HSP70 protege contra hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e resistência insulínica. Esta proteção parece estar fortemente associada ao efeito inibidor da HSP70 sobre a ativação da JNK. Deste modo, a via de fosforilação do IRS-1 e 2 em Serina é inibida, e a resistência à insulina é diminuída (CHUNG et al., 2008).

Outrossim, a hipótese de que a redução na expressão das proteínas de choque térmico esteja envolvida na patogênese da resistência insulínica no músculo esquelético vem sendo continuamente investigada. Estudos com animais obesos (induzidos por dieta hiperlipídica) mostram que a terapia de choque térmico melhora a tolerância à glicose, restaura o transporte de glicose estimulado por insulina, e aumenta a sinalização da insulina no músculo esquelético, protegendo-o do desenvolvimento da resistência insulínica, todos associados ao aumento da expressão de HSP70 e consequente inibição da JNK (GUPTE *et al*, 2008).

Estudos baseados em biópsia de músculo esquelético de pacientes diabéticos (DM2) mostram que, nestes, o nível de expressão de mRNA de HSP72 muscular é reduzido se comparado àqueles de sadios. Os níveis de mRNA HSP72 no músculo

esquelético de indivíduos diabéticos estão correlacionados com diversos parâmetros do metabolismo de carboidratos e de lipídeos. Correlacionam-se fortemente com eventos metabólicos estimulados por insulina, como o aumento da captação, da oxidação e do armazenamento de glicose e diminuição da oxidação de lipídeos (KURUCZ *et al.*, 2002). Corroborando esses achados, estudos em humanos com DM2 demonstram que, além da redução na expressão de HSP70 no músculo esquelético estar positivamente correlacionada ao grau de resistência insulínica, ela está negativamente correlacionada com as concentrações de glicose em jejum (HOOPER & HOOPER, 2005). Nakhjavani e colaboradores (2010) mostram que, em pacientes com DM2, o aumento das concentrações de HSP72 extracelular está associada à duração do diabetes e portanto, correlacionando-se positivamente à cronicidade da doença.

Pesquisa realizada com pacientes diabéticos submetidos à terapia com banho quente (*hot-tub therapy - HTT*) indica que esta terapia causa redução nas complicações do diabetes. Foi mostrado que, nestes pacientes, a terapia de banho quente reduziu em 18% a dose de insulina utilizada, preveniu a hipoglicemia e reduziu o peso corporal, a glicemia em jejum e as concentrações de hemoglobina glicada (HOOPER, 1999). Outros estudos, envolvendo modelos experimentais com animais diabéticos, induzidos por estreptozotocina, e submetidos à terapia de choque térmico (41°C por 30min), também demonstram efeitos positivos desta terapia para a melhora do perfil lipídico, da capacidade antioxidante e da secreção de insulina (BATHAIE *et al.*, 2010). Estudos demonstram ainda que HSP70 apresenta ação moduladora sobre a resposta imunológica (JOHNSON & FLESHNER, 2006) em doenças crônicas como o diabetes, a obesidade e a resistência insulínica (CHUNG *et al.*, 2008; RODRIGUES-KRAUSE *et al.*, 2012).

## HSP EXTRACELULAR: AÇÕES E REGULAÇÃO DA SECREÇÃO POR FATORES METABÓLICOS

O primeiro registro de que a HSP70 havia sido detectada na circulação sanguínea data do final dos anos 80 (HIGHTOWER & GUIDON 1989; POCKLEY *et al.* 1998). Contudo, a origem celular e a função fisiológica da HSP70 extracelular (eHSP70) ainda não estão totalmente esclarecidas. Até o presente momento, o papel das proteínas de choque térmico extracelulares parece envolver especialmente ações imunorregulatórias, pró-inflamatórias e sinalizadoras de dano ou risco de dano celular (WILLIAMS & HUNTER-LAVIN, 2007). Após serem liberadas no fluido extracelular, podem-se ligar na superfície da membrana celular e iniciar uma cascata de eventos de transdução de sinais, e/ou transportar moléculas como peptídeos antígenos. Além de presentes na circulação, estas proteínas podem ser encontradas na superfície externa da membrana celular (HENDERSON, 2010).

Inicialmente, foi sugerido que a liberação de eHSP70 seria consequência da ruptura da membrana celular em necroses. Atualmente, sabe-se que esta proteína também pode ser liberada por células em condições normais. Diversos estudos têm mostrado que uma variedade de tipos celulares secreta estas proteínas de estresse, como as células neuronais, os monócitos, os macrófagos, os linfócitos B e as células tumorais e o tecido adiposo marrom (CALDERWOOD *et al.*, 2007). Os mecanismos envolvidos na liberação de proteínas de choque térmico na circulação podem ser classificados em passivos, por necrose, trauma ou infecção, e, ativos, por inflamação, exercício e estresse psicológico. De modo geral, é sugerido que a liberação de eHSP70 na circulação se dê como HSP livre ou compartimentalizada em exossomos (pequenas vesículas), que contém tanto a forma induzível quanto a constitutiva (ASEA, 2007).

Além disso, as HSPs também podem ser expressas na superfície da membrana celular, onde podem exercer função imunoestimuladora, induzindo resposta das células

*Natural Killers* contra agentes agressores (WILLIAMS & HUNTER-LAVIN, 2007). A expressão de HSP72 na superfície parece ser limitada às células tumorais, e tem função na estimulação tanto do sistema imunológico adaptativo como inato. Pelo fato de que a interação requer contato célula-célula, a HSP expressa na superfície da membrana celular pode produzir uma resposta bem localizada (MULLTHOFF, 2007). Ainda, foi demonstrado que a HSP70 extracelular pode exercer efeitos imunológicos, ligando-se a um receptor, ou associando-se aos lipídeos da membrana (MULLTHOFF & HIGHTOWER, 2011).

A presença de HSP70 no meio extracelular pode iniciar cascatas de sinalização em muitos tipos de células mediadas por receptores da superfície da membrana. Dentre eles, incluem-se os *Toll Like Receptors*-TRL2, TRL-4, CD40, CD91, CCR5 e membros de família de receptores *scavenger* (CALDERWOOD, 2007). A eHSP70 pode ligar-se a receptores altamente conservados denominados receptores do tipo TLR-2 e TLR-4, localizados na superfície de células apresentadoras de antígenos, induzindo à produção de citocinas pró-inflamatórias (interleucina 1 $\beta$ - IL-1 $\beta$  e fator  $\alpha$  de necrose tumoral - TNF- $\alpha$ ) e à produção de óxido nítrico -NO (que possui importante propriedade microbicida). Estes efeitos são desencadeados pela ligação aos receptores do tipo *Toll* que estimulam a ativação do NF- $\kappa$ B e, deste modo, a produção de citocinas pró-inflamatórias (ASEA, 2008).

A capacidade de ligação desta proteína na superfície celular é uma propriedade de muitos tipos de células, incluindo células de linhagem hematopoiética, neuronais, vasculares e outras células epiteliais, sugerindo que a liberação e a ação destas proteínas são um fenômeno bastante difundido, estando implicado em grande número de eventos fisiológicos e patológicos (DE MAIO *et al.*, 2012). A grande maioria dos registros de liberação/detecção de HSP70 no ambiente extracelular está associada às situações patológicas como hipertensão, doença renal, aterosclerose, obesidade, diabetes, entre outras (FLESHNER *et al.*, 2007; RODRIGUES-KRAUSE *et al.*, 2011).

A liberação de proteínas de choque térmico também pode ocorrer pela exposição ao estresse físico, trauma, estresse de comportamento, assim como pela exposição a sinais de dano. Johnson e colaboradores (2005) mostraram que receptores  $\alpha$ -adrenérgicos estão implicados no aumento na concentração de eHSP72 após a

exposição a estressores físicos e psicológicos em humanos e em animais de laboratórios, sendo que esta liberação pôde ser bloqueada por prazosina, antagonista específico para receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos. Nesse estudo, foi verificado que o aumento circulante de eHSP72, ocorrido durante a exposição ao agente estressor, deve-se à ativação do sistema nervoso simpático e à liberação de noradrenalina, indicando que o aumento de eHSP70 no plasma pode ser considerado característica potencial da resposta aguda ao estresse.

Em resposta às condições de estresse, as células do nosso corpo liberam sinais de alerta para o todo do organismo relativo, ou seja, ocorre comunicação de modo a ajustar a atividade celular à nova condição. Entre os sinais produzidos e liberados, encontram-se as proteínas do estresse (DE MAIO, 2011). No ambiente extracelular, as HSPs podem sinalizar alarme sistêmico relativo ao trauma celular (CALDERWOOD et al., 2007). Neste contexto, evidencia-se a participação do sistema imunológico na exportação de proteínas de choque térmico, como sinal de alerta aos demais sistemas. Já está descrito que células do sistema imunológico, como linfócitos T também podem sintetizar e exportar HSP70 para o ambiente extracelular (eHSP70) (HUNTER-LAVIN et al., 2004; IRELAND et al., 2007; HECK, 2011).

Rodrigues-Krause e colaboradores (2012) observaram que a concentração de eHSP70 é elevada nos diabéticos obesos, e a concentração intracelular de HSP70 é menor em pacientes diabéticos e menos evidente, ainda, em diabéticos obesos, indicando que a obesidade e suas complicações podem ser as principais causas de elevação de eHSP70 em pacientes diabéticos.

Outros trabalhos mostram também que concentrações de eHSP70 estão aumentados em pacientes sépticos, e são associados a maior mortalidade. Nestes pacientes, os níveis de eHSP70 no plasma podem ser modulados de acordo com o estado oxidativo; pacientes sépticos com perfil pró-oxidante apresentam concentrações séricas de eHSP70 mais elevadas, possivelmente, devido à secreção ativa causada pelo dano celular ou liberação por células necróticas (GELAIN et al., 2011). Walsh e colaboradores (2001) demonstraram que indivíduos saudáveis apresentam rápido aumento da concentração de eHSP72 induzido pelo exercício físico, evidenciando uma liberação não associada à patologia, como comumente reportado. Ainda, observaram que o

aumento na concentração de eHSP72 circulante era precedido de maior expressão dos genes e da proteína no músculo; contudo, o aumento da concentração de eHSP72 circulante não teve origem no próprio músculo em contração, conforme mensurado pela diferença arteriovenosa, indicando que esta liberação, induzida pelo exercício, advém de outro tecido (FEBBRAIO *et al.*, 2002a).

Neste sentido, outras investigações mostraram que tecidos do território hepatoesplâncnico liberam eHSP72, e contribuem, em parte, para a elevação da eHSP72 circulante durante o exercício, sugerindo que a liberação desta proteína de estresse seja liberada com uma função específica e importante durante o mesmo (FEBBRAIO *et al.*, 2002b). Estudos subsequentes mostraram que ingestão de glicose durante o exercício atenua o aumento sérico da eHSP72 induzido pelo exercício, e sugerem que esta atenuação se deva à redução do estresse metabólico hepático (FEBBRAIO *et al.*, 2004).

HECK (2011), analisando o perfil intra e extracelular de HSP70 em linfócitos de animais submetidos ao estresse/desafio de exercício físico, verificou que o controle da ativação do NF- $\kappa$ B parece depender de um equilíbrio necessário na razão HSP70 extra/intracelular, sendo o aumento exagerado desta razão sinal de alerta imunológico aos demais sistemas. Manter este equilíbrio passa a ser fundamental na resposta do organismo aos desafios. Igualmente, a razão HSP70 extra/intracelular pode ser utilizada como ferramenta de aferição clínica em outras situações de desafio ao organismo, como é o caso da sepse.

Estudos realizados com mulheres obesas grávidas mostram que a ingestão de glicose aumenta a concentração de eHSP72 extracelular, onde os pesquisadores avaliaram a concentração de HSP72 antes e após (1h) da ingestão de glicose (50g), verificando aumento na concentração desta proteína na ordem de 100% (pré-ingestão: 2,8ng/ml para pós-ingestão: 5,6ng/ml), acompanhado de aumento na insulinemia. Os autores da pesquisa acreditam que o aumento de eHSP72 detectado tenha origem intracelular, ou seja, HSP72 pré-sintetizada (JAFFE *et al.*, 2013).

Na literatura consultada sobre as proteínas de choque térmico, constata-se que a HSP70 exerce diversos e distintos papéis no ambiente intra e extracelular relacionados ao controle glicêmico. Deste modo, parece-nos importante investigar o papel fisiológico

desta proteína do estresse no ambiente extracelular em animais sadios submetidos a diferentes condições e desafios: metabólico e térmico.

## **INSULINA: CARACTERIZAÇÃO, AÇÕES, EFEITOS E RESISTÊNCIA**

A insulina é um peptídeo de aproximadamente 5,8 kDa formado por duas cadeias peptídicas interligadas por pontes dissulfeto. Sua secreção pelas células  $\beta$ -pancreáticas é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis, sendo a glicose o secretagogo mais importante.

Na circulação, apresenta meia-vida de 5-10 minutos, sendo degradada principalmente no fígado e nos rins. A remoção de insulina da circulação ajuda a controlar a resposta celular ao hormônio diminuindo sua disponibilidade. Cerca de 50% da insulina na circulação porta são removidos durante sua passagem pelo fígado, mas esse percentual varia amplamente em diferentes condições, ou seja, a captação hepática de insulina é influenciada tanto por fatores fisiológicos como patológicos, e envolve diferentes sistemas e controles. Contudo, sua remoção da circulação não implica sua destruição imediata. Quantidade significativa de insulina associada ao receptor é liberada a partir da célula (hepática e muscular) e volta para a circulação. Estima-se que a degradação de uma única molécula de insulina leve cerca de 70 minutos desde sua liberação na circulação (DUCKWORTH et al., 1998).

Uma vez liberada na corrente sanguínea, a ação da insulina inicia-se pela sua ligação aos seus receptores específicos localizados na superfície da membrana plasmática de quase todos os tecidos dos mamíferos, com concentrações que variam desde 40 receptores/célula nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 nas células adiposas e hepáticas (HABER *et al.*, 2002).

O receptor de insulina pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento que apresentam atividade da tirosina quinase intrínseca, ou seja, após ligação da insulina ao receptor, este sofre autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina. Este receptor é composto por duas subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$ ) ligadas por pontes dissulfeto (S-S), sendo a subunidade  $\alpha$  totalmente extracelular, e a que contém o sítio de ligação para a insulina. A subunidade  $\beta$  tem localização transmembrânica, apresenta atividade quinase estimulada por insulina sendo capaz de fosforilar a si própria e a outros substratos em aminoácido tirosina, tendo como doador de fosfato o ATP (MORAES *et al.*,2011).

A interação da insulina à subunidade alfa do receptor causa a ativação da função quinase do receptor, que propaga o sinal fosforilando seus substratos (substratos do receptor de insulina - IRS) em seus resíduos tirosina. Portanto, as etapas iniciais de sinalização intracelular em resposta à ligação da insulina ao seu receptor de membrana são fundamentais para a propagação do sinal e para o efeito biológico deste hormônio. Sabe-se que o substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) e o substrato 2 do receptor de insulina (IRS2) fosforilados terão associados a si proteínas como a enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), ativando-a, o que aumenta a concentrações teciduais de fosfatidilinositol-3-fosfato e desencadeia a ativação de outras proteínas importantes, como a proteína quinase B (Akt) e a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). A ativação da Akt aumenta a expressão e a atividade da glicogênio sintase e, conseqüentemente, o armazenamento de glicogênio. Além disso, a isoforma 2 da Akt (Akt2) parece controlar a translocação do transportador de glicose-4 (GLUT4) para a membrana em células adiposas e musculares, aumentando a captação de glicose.

As alterações na via PI3K/Akt são mecanismos moleculares envolvidos na causa da resistência insulínica, especialmente em tecidos onde o GLUT-4 tem expressão relevante (PETERSEN *et al.*, 2006). O transportador de glicose-4 (GLUT4) é o transportador insulínico independente mais abundante nas membranas celulares do músculo esquelético, cardíaco e tecido. Sem o estímulo da insulina, a concentração de GLUT-4 na membrana destas células é muito baixa, pois estes transportadores encontram-se armazenados/confinados em vesículas localizadas no citossol. Após a estimulação pela insulina, esses transportadores são translocados e inseridos na membrana das células,



resultando em aumento da captação de glicose. O conceito de que a sinalização de insulina causa o recrutamento do GLUT-4 do *pool* intracelular para regiões próximas da membrana plasmática foi confirmado por meio uma técnica de microscopia com fluorescência de reflexão interna total (TIRF), que permite a imagem de uma região de cerca de 100-250 nm a partir da superfície de fora da membrana plasmática até o citoplasma. A aplicação da TIRF revelou que a insulina aumenta as concentrações totais de GLUT-4 nesta região do adipócito em 2 a 3 vezes (PRADA & SAAD, 2011).

O receptor de insulina, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que atenua a transmissão do sinal pela diminuição da capacidade de auto fosforilação do receptor em tirosina após estímulo insulínico. Essas fosforilações inibitórias podem provocar resistência à insulina. As desordens metabólicas que incluem a resistência insulínica estão relacionadas a um estado pró-inflamatório que resulta na secreção de citocinas inflamatórias e na consequente ativação de fatores intracelulares, em células do fígado, do músculo esquelético e dos adipócitos, reduzindo a resposta à insulina. (HOOPER & HOOPER, 2009).

A resistência à insulina pode ser decorrente da ativação sequencial de proteínas quinases, como a quinase inibidora (IKK- $\beta$ ) do NF- $\kappa$ B, a proteína quinase C (PKC) e a *c-Jun N-terminal quinase* (JNK), já que estas quinases fosforilam o IRS-1 em resíduos de serina, acarretando redução na atividade da PI3-K e, conseqüentemente, diminuição do transporte de glicose (MORAES, et al., 2011). A IKK $\beta$  promove a dissociação do complexo I $\kappa$ B/NF- $\alpha$ B no citoplasma de modo que este fator de transcrição migre até o núcleo da célula, ativando os genes responsáveis pela transcrição de diversas proteínas, entre elas citocinas pró-inflamatórias, que acentuam mais ainda os efeitos negativos sobre a via de sinalização insulínica (PAULI, 2011). As citocinas pró-inflamatórias influenciam o *status* da resposta à insulina podendo levar à resistência insulínica de maneira aguda ou crônica. Indivíduos com intolerância à glicose têm altas concentrações basais de citocinas inflamatórias e apresentam alta e sustentada liberação de citocinas em resposta a picos hiperglicêmicos (ANDERSEN *et al.*, 2004).

A resposta severa ao estresse pode causar resistência insulínica por ação de citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF- $\alpha$  (*Fator  $\alpha$  de Necrose Tumora*) (MATHONNET & CARIOU, 2007). A ligação destes agentes pró-inflamatórios aos receptores específicos

ativa as vias de sinalização intracelular, facilitando a ativação do NF- $\kappa$ B e a fosforilação da quinase c-Jun-N-terminal (JNK), inibindo a transdução do sinal da insulina. A JNK é ativada também por estresse e ácidos graxos. Sua atividade serina quinase, capaz de fosforilar em serina os IRS-1 e 2, contribui de modo importante para a resistência à insulina. Nesta linha, estudos investigativos sobre a ativação desta quinase dão destaque não só para a participação dos *Toll like receptors* (TRLs) sensíveis a patógenos, a nutrientes como ácidos graxos (no caso do TRL-4), mas também para proteínas de choque térmico (HSPs). A ativação destes receptores aciona vias de sinalização inflamatória incluindo a ativação da JNK e IKK $\beta$ , cujo resultado é o bloqueio da ação insulínica (MORAES et al., 2011).

Situações de estresse inflamatório também podem afetar as vias de regulação da disponibilidade de glicose não dependentes de insulina, como a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), enzima sensível ao *status* energético intracelular (ANDREASEN et al., 2009).

#### **POSSIBILIDADE DE INTERAÇÃO ENTRE AS VIA DAS HSP70 E DA RESPOSTA À INSULINA: QUESTÕES A SEREM RESPONDIDAS**

Situações de estresse, como o exercício físico intenso, elevam a concentração plasmática de HSP72 (WALSH et al. 2001) e essa liberação tem, em parte, a participação de tecidos hepatoesplâncnicos (FEBBRAIO et al., 2002b). De fato, Walsh e colaboradores (2001) observaram que indivíduos saudáveis não treinados, quando submetidos a sessões de 60 min de exercício em esteira motorizada com velocidade pré-determinada, mostravam expressivo aumento das concentrações plasmáticas da forma induzível da HSP70 (HSP72), particularmente entre os tempos de 30 a 60 min após a atividade física. Observaram ainda, que esta HSP72 extracelular (eHSP72) permanecia em concentrações detectáveis acima dos valores basais mesmo 24 h após o término do exercício. Neste

estudo, foi observado também que o aumento da eHSP72 circulante é acompanhado de maior expressão gênica de HSP72 no músculo em atividade.

Estudos subsequentes desenvolvidos por Febbraio et al. (2002), também realizados com humanos saudáveis submetidos ao exercício físico, foram conduzidos no sentido de detectar o(s) tecido(s) produtor(es) da eHSP72. Com base na mensuração da diferença arteriovenosa do conteúdo de eHSP72 entre diferentes territórios, o grupo do Prof. Febbraio mostrou que a liberação de eHSP72 durante o exercício tem origem em algum tecido do território hepatoesplâncnico; contudo, ainda não se sabe qual tecido seria o responsável pela liberação da proteína de estresse.

O exercício físico não é a única forma de estresse homeostático que o organismo encontra. Consequentemente, a concentração de eHSP70 na circulação pode aumentar em resposta à presença de outros agentes ou condições de estresse incluindo-se o trauma, a infecção severa, além do estresse psicológico. Neste sentido, Johnson e colaboradores (2005) estudaram a mediação do eixo hipófise-adrenal e do sistema nervoso simpático, responsáveis pela defesa e alarme diante de situações de estresse, sobre a liberação de HSP70 para a circulação. Os autores utilizaram ratos adultos adrenalectomizados e hipofisectomizados, submetidos a tratamento com glicocorticoide, tirosina, agonistas e antagonistas adrenérgicos, e, posteriormente, expostos a estresse por choque elétrico na cauda. Nesse estudo, os pesquisadores observaram que a remoção das glândulas adrenais não interfere na liberação de HSP72 na circulação, sugerindo que a corticosterona (principal glicocorticoide em ratos), apesar de presente no plasma em alta concentração durante situações de estresse, não está envolvida na liberação de eHSP72 durante a exposição ao estresse. Os autores também verificaram que os glicocorticoides não foram capazes de provocar lesão/necrose celular, o que certamente contribuiria para a elevação do conteúdo de HSP70 na circulação. O trabalho mostrou ainda que a ausência do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na circulação (pela remoção da hipófise) não afeta a liberação de HSP72, indicando que o eixo ACTH-glicocorticoide não está diretamente envolvido na liberação de HSP72 para a corrente sanguínea em situação de estresse. Desta forma, importantes mecanismos fisiológicos clássicos de resposta ao estresse não estiveram envolvidos na liberação de eHSP72 para a circulação. Contudo, os pesquisadores observaram que o

tratamento dos animais com antagonistas adrenérgicos não específicos (como o labetalol) e específicos para receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (como a prazosina) foram capazes de bloquear a liberação de HPS72 induzida por estresse, enquanto que o antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol teve ação oposta, aumentando ainda mais a liberação de HPS72. Estes achados trouxeram à tona uma nova faceta da resposta simpática ao estresse: a indução da exportação de HSP72 para a circulação via receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.

Como discutido acima, durante o exercício físico, ocorre liberação de eHSP72 para o plasma a partir de órgãos do território hepatoesplâncnico. Por isso, e pelo fato de o exercício físico ser potente modulador metabólico através do aumento na atividade simpática para o mesmo território hepatoesplâncnico (aumento da liberação de glicose pelo fígado, redução da secreção de insulina pelo pâncreas), o grupo do Prof. Febbraio levantou a hipótese de que a glicose poderia ser moduladora da exportação de eHSP72 para o plasma durante o exercício físico. De fato, ao estudarem novamente indivíduos saudáveis não treinados submetidos a uma sessão de exercício em cicloergômetro, Febbraio et al. (2004) observaram que o conteúdo de eHSP72 sérica arterial aumentou em todos os sujeitos, independente de serem ou não tratados com solução rica em carboidratos. Contudo, o conhecido aumento na liberação hepatoesplâncnica de eHSP72 foi completamente atenuado em indivíduos que receberam glicose sendo que, aparentemente, esta queda não parece ter sido devida a alguma alteração no conteúdo de glicogênio muscular, pois a concentração de glicogênio muscular reduziu igualmente em indivíduos que receberam ou glicose via oral.

Esses achados levam à seguinte questão: Qual a relação, durante situações estressantes, entre a liberação de eHSP72 para o plasma e o sistema nervoso simpático e concentração de glicose circulante?

Considerando-se que as HSP70 operam como *chaperonas* moleculares no ambiente intracelular, ligando-se fortemente a outros peptídeos, uma possível resposta à questão acima seria que, em situações de estresse, a estimulação simpática de tecidos hepatoesplâncnicos (*e.g.* fígado, pâncreas) levaria também à liberação de eHSP70 a qual, agindo como *chaperona* extracelular, ligar-se-ia à insulina bloqueando seus efeitos

hipoglicemiantes. Além disso, o estímulo simpático aumenta a produção de glicose, e reduz a secreção de insulina pelo pâncreas.

Esta hipótese é reforçada pelo fato de que, durante situações de estresse homeostático, como a hipoglicemia e o próprio exercício físico, os sistemas fisiológicos operam no sentido de aumentar a disponibilidade de glicose plasmática. Portanto, tendo sido as HSP70 minuciosamente selecionadas e mantidas extremamente conservadas durante a evolução dos vertebrados, não se pode descartar a possibilidade de que esta classe de proteínas tenha participado da evolução do sistema de controle metabólico durante situações de fuga ou luta dos animais. Considerando-se, ainda, que, durante o exercício físico, o próprio músculo esquelético não depende da insulina para a captação de glicose (JESSEN & GOODYEAR, 2005), e que cada molécula de insulina secretada permanece na circulação por mais de uma hora (DUCKWORTH et al., 1998), parece plausível deduzir-se que o exercício poderia levar a uma situação de hipoglicemia ameaçadora da homeostase, caso as moléculas de insulina, ainda não removidas da circulação, não fossem retiradas de cena.

# OBJETIVOS

---

## OBJETIVO GERAL:

- Investigar a possibilidade de interação molecular entre a eHSP70 plasmática e o hormônio insulina circulante e respectiva implicação na modulação da disponibilidade de glicose na circulação.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estudar a ocorrência de ligação entre a insulina e a HSP70 em modelos *in silico* e em situações reais em amostras de plasma e de soro fetal bovino.
- Determinar as concentrações plasmáticas de HSP70 de animais em condições de jejum, de hipoglicemia induzida e, submetidos a choque térmico.
- Determinar as concentrações plasmáticas de insulina e ácidos graxos de animais submetidos a choque térmico.
- Investigar o efeito do choque térmico sobre a tolerância à glicose e tolerância à insulina, e a implicação da inibição da síntese de HSP70 e do bloqueio da sua ação sobre a disponibilidade de glicose circulante durante teste de tolerância a glicose.
- Investigar o efeito do choque térmico e da eHSP70 exógena sobre a captação tecidual de glicose (2-DG) radiomarcada em modelo *in vivo* e em tecido isolado (*ex vivo*).

# MATERIAIS E MÉTODOS

---

## LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Celular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Laboratório de Ensaio Biológicos, da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI). Os procedimentos relativos à utilização de radioativos e os ensaios imunoenzimáticos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Celular da UFRGS, e os demais procedimentos, no Laboratório de Ensaio Biológicos da UNIJUI.

Os experimentos relativos à obtenção de plasma para experimentos de co-precipitação de insulina - HSP70 foram desenvolvidos em parceria com o Laboratório do Prof. Dr. Roberto Bazotte, da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Os tratamentos de choque térmico foram realizados em laboratório climatizado com temperatura ambiente mantida entre 22-24°C.

## CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFRGS), sob nº 18858, de 04 de outubro de 2011, após prévia revisão realizada por parecerista *ad hoc* nomeado para o projeto por comissão específica do

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL**

O tamanho da amostra foi calculado com a utilização do programa Minitab versão 15, utilizando-se como base para cálculo os resultados de protocolos experimentais de nosso laboratório e de outros grupos de pesquisa. Foi utilizado para o cálculo um poder estatístico de 80% para nível de significância de 0,05%.

### **SEGURANÇA PROCEDIMENTAL**

Todos os procedimentos com animais e manipulação de reagentes foram realizados com o uso de equipamentos de proteção de individual adequado ao procedimento (avental, luva cirúrgica, máscara, óculos de proteção), levando-se em consideração os devidos cuidados necessários para proteção e segurança dos animais e dos pesquisadores envolvidos.



## ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar (Rattus norvegicus, var. Albinus)*, com 2-3 meses de idade, provenientes dos biotérios do ICBS (CREAL) da UFRGS e da UNIJUÍ. Os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro 12h/12h, temperatura ambiente a  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa do ar a 60%, alimentados *ad libitum*, com dieta comercial padrão para ratos de laboratório, NUVILAB, contendo aproximadamente 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos e com livre acesso a água.

Foram utilizados 240 animais divididos em números (n) diferentes nos grupos e tempos experimentais. O número de animais (n) por grupo e tempo experimental está descrito nas legendas das figuras no capítulo HIPÓTESES, PREDIÇÕES E RESULTADOS. Sempre que adequado experimentalmente e tecnicamente, os mesmos animais (amostras de plasma e tecidos) foram utilizados para diferentes análises (glicemia, insulinemia, HPS72 e HSP73, ácidos graxos). O percentual de perda de animais que morreram em razão do choque térmico e/ou do anestésico foi de cerca de 10%.

## **PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE PLASMA PARA EXPERIMENTOS DE COIMUNOPRECIPITAÇÃO DE INSULINA - HSP70 e DOSAGEM DE GLICOSE, INSULINA E HSP70**

Os experimentos relativos aos dados apresentados nas Figuras 8-11 foram desenvolvidos com material biológico (plasma) obtido em parceria com o Laboratório do Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte, da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

As amostras de plasma foram obtidas de animais organizados nos seguintes grupos:

Grupo 1=alimentado;

Grupo 2=jejum de 15 horas;

Grupo 3=jejum de 15 horas, mortos 4h após administração de insulina Detemir;

Grupo 4=jejum de 15 horas, mortos 10 horas após administração de insulina Detemir;

Grupo 5= alimentado;

Grupo 6= jejum de 6 horas;

Grupo 7= jejum de 6 horas, mortos 15 minutos após a administração de insulina Regular;

Grupo 8=jejum de 6 horas, mortos 60 minutos após administração de insulina Regular,

Grupo 9= jejum de 6 horas, mortos 180 min após a administração de insulina Regular.

A insulina Regular (de ação rápida) e a insulina Detemir (de ação lenta) foram administradas na dose de 1 UI/kg de peso.

## PROTOCOLO PARA EXPERIMENTOS DE CHOQUE TÉRMICO

Neste protocolo experimental, os animais foram divididos em dois grupos experimentais:

- ❖ Grupo de animais que mantinham sua temperatura corporal constante, denominados de **CONTROLE (C)**.
- ❖ Grupo de animais que tinham sua temperatura corporal elevada para 41-42 °C, ou seja, submetidos ao choque térmico agudo, denominados de **CHOQUE TÉRMICO (HS)**.

Animais de ambos os grupos foram anestesiados com xilazina 10 mg.kg<sup>-1</sup> (0,05 mL de xilazina 2% para 100 g de rato) e cetamina 90 mg.kg<sup>-1</sup> i.p. (0,09 mL de cetamina 10% para 100 g de rato). O objetivo da anestesia era a supressão do controle da temperatura do grupo HS, para indução da hipertermia. Os animais do grupo C foram mantidos em temperatura ambiente com temperatura corporal controlada para que se mantivessem normotérmicos.

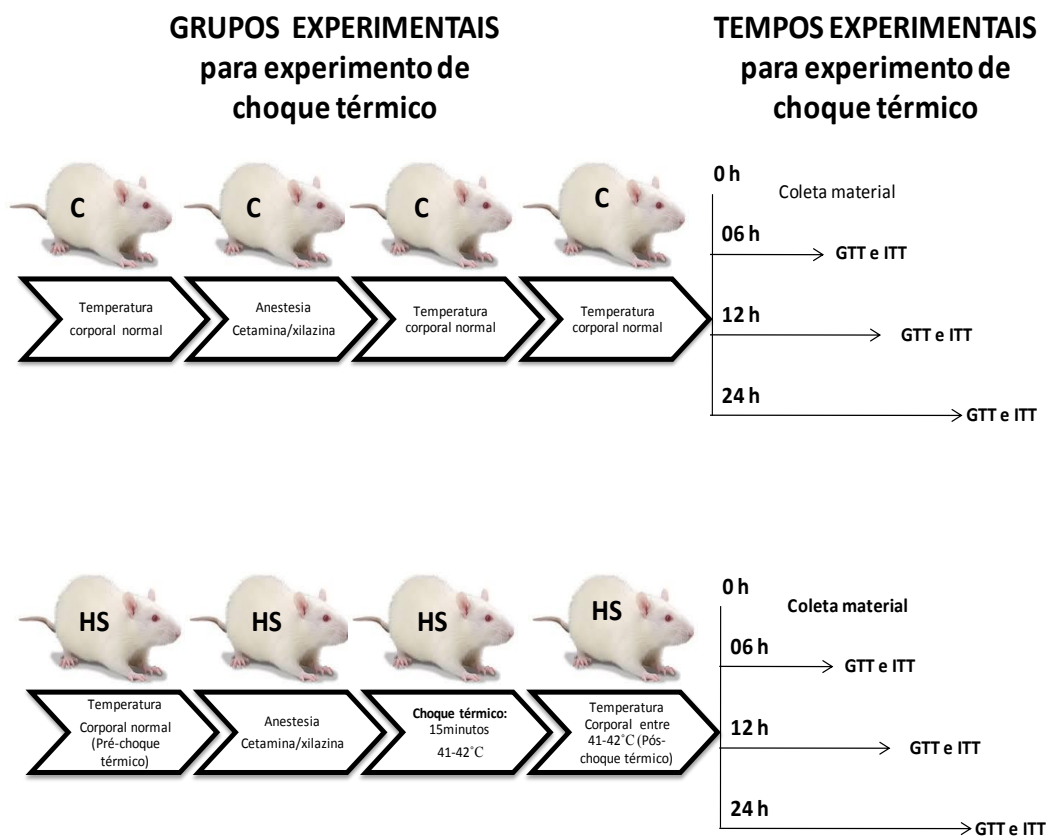
Alguns animais (conforme o protocolo) constituíram grupos com denominação distinta, como descrito abaixo, porém seguiram a orientação geral de denominação **HS** para os grupos submetidos ao choque térmico.

## TEMPOS EXPERIMENTAIS PARA EXPERIMENTOS DE CHOQUE TÉRMICO

**Tempo experimental**, neste trabalho, é considerado o tempo decorrido entre a realização do choque térmico e o procedimento experimental de teste de tolerância à glicose, teste de tolerância a insulina, ou administração de glicose para outras análises e

coleta de material biológico. Os grupos experimentais foram organizados dentro de diferentes tempos experimentais a seguir listados:

- Tempo **zero** pós-choque (0 h): para procedimentos ou análises realizadas imediatamente após o choque térmico;
- Tempo **06** horas pós-choque (6 h): para procedimentos ou análises realizadas 6 horas após o choque térmico;
- Tempo **12** horas pós-choque (12 h): para procedimentos ou análises realizadas 12 horas após o choque térmico;
- Tempo **24** horas pós-choque (24 h): para procedimentos ou análises realizadas 24 horas após o choque térmico (Figura 1).



**Figura 1. Representação esquematizada dos grupos e tempos experimentais de ensaios *in vivo*.** Grupo **controle (C)**: animais que mantinham sua temperatura corporal normal; Grupo **choque térmico (HS)**: animais cuja temperatura corporal foi elevada para 41-42°C durante banho em água a temperatura de 41-42°C. **Tempos experimentais:** são os diferentes tempos decorridos entre a realização do choque térmico (ou apenas anestesia) e o procedimento experimental (teste de tolerância à glicose, teste de tolerância à insulina, ou administração de glicose para outras análises, coleta de material biológico). O número (n) de animais por grupo e tempo experimental variou de 4-9, conforme apresentado nas legendas das figuras dos resultados.

## MODELO DO CHOQUE TÉRMICO

Nos experimentos *in vivo*, o procedimento do choque térmico foi realizado com os animais anestesiados com xilazina 10 mg.kg<sup>-1</sup> (0,05 mL de xilazina 2% para 100 g de rato) e cetamina 90 mg.kg<sup>-1</sup> i.p. (0,09 mL de cetamina 10% para 100 g de rato).

A temperatura dos animais foi monitorada com termômetro retal durante todo o período em que os animais eram mantidos no banho com água a 42 °C. Após alcançarem a temperatura corporal de 41 °C permaneceram no banho com monitoramento contínuo da temperatura (41-42 °C) durante quinze (15) minutos. O rato ficava imerso na água, exceto a cabeça e patas dianteiras. O procedimento utilizado foi adaptado do modelo utilizado por Chung et al. (2008).

Os animais não submetidos ao choque térmico também foram anestesiados, porém mantidos na temperatura corporal entre 36,5-37,5 °C, verificada com termômetro retal. Após o choque térmico e/ou anestesia, os animais permaneciam no laboratório mantido na temperatura ambiente de 22-24 °C até recuperação da anestesia. Após, os animais foram mantidos em biotério até o momento da realização dos demais procedimentos (GTT, ITT ou administração de glicose fria e marcada com radioativo).

## TESTES DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E À INSULINA

Os testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT) foram realizados em diferentes tempos experimentais, ou seja, seis (06), doze (12) e vinte e quatro (24) horas após o choque térmico (ver “Tempos Experimentais” acima descritos). Os protocolos experimentais para o desenvolvimento destes testes são apresentados a seguir:

### TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)

Para a realização do teste de tolerância à glicose, foi preparada uma solução de glicose 80% (m/v), administrada na concentração 1g/kg, por via intraperitoneal (IPGTT).

Para a obtenção da curva glicêmica, o valor da glicemia em jejum foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos (*tempo zero*) e nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose. As medidas da glicemia foram feitas com sangue total em punção na parte distal da cauda dos animais, usando aparelho de leitura glicêmica capilar, glicosímetro, *Optium Xceed* da *Abbott*.

Para este teste (GTT), foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

- ❖ Grupo **C (controle)**: animais mantidos com temperatura normal antes da administração de glicose.
- ❖ Grupo **HS (*heat shock*)**: animais submetidos a **choque térmico** antes da administração de glicose.

Os testes de tolerância à glicose foram realizados com animais em duas condições experimentais:

- Condição de **JEJUM**: animais mantidos em jejum por 12 horas antes da realização do GTT.
- Condição de **ALIMENTADO**: animais mantidos sem restrição alimentar antes da realização do GTT.

Foram realizados também testes de tolerância à glicose em animais tratados com anticorpo anti-HSP70 para os quais se utilizou o anticorpo **Anti – HSP72/HSP73 (3A3) da Santa Cruz - SC32239**. A concentração do anticorpo administrado foi de 20ng/mL de sangue circulante final (ver cálculo no item de “Cálculos e Equações”), por via intraperitoneal, duas (02) horas antes do início do GTT.

O teste de tolerância à glicose foi realizado **12 horas** depois dos animais terem sido submetidos ao choque térmico (grupo HS). Nestes experimentos, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- ❖ Grupo **C (controle)**: animais mantidos com temperatura normal receberam glicose.
- ❖ Grupo **AC (anticorpo)**: animais mantidos com temperatura normal receberam anticorpo anti-HSP70 e glicose.
- ❖ Grupo **HS (heat shock)**: animais submetidos a choque térmico 12 horas antes de receber glicose.
- ❖ Grupo **HS-AC (heat shock + anticorpo)**: animais submetidos a choque térmico antes de receberem glicose e anticorpo anti-HSP70.

Ainda, foram realizados testes de tolerância glicose em animais tratados com quercetina, para inibição da expressão de HSP70 (ELIA & SANTORO, 1994). Utilizou-se Quercetina diidrato (Sigma), administrada 1 h antes do choque térmico, por gavagem, à dose de 200 mg/kg veiculada em água. Os animais do grupo ‘**controle**’ e ‘**heat shock**’ receberam água por gavagem. Os volumes administrados foram de 125 µL para cada 100 g de peso corporal.



O teste de tolerância à glicose foi realizado **12 horas** depois de os animais terem sido submetidos ao choque térmico (grupo HS). Nestes experimentos, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- ❖ Grupo **C (controle)**: animais mantidos com temperatura normal receberam glicose.
- ❖ Grupo **Q (quercetina)**: animais mantidos com temperatura normal receberam anticorpo anti-HSP70 e glicose.
- ❖ Grupo **HS (heat shock)**: animais submetidos a choque térmico 12 horas antes de receber glicose.
- ❖ Grupo animais **HS-Q (heat shock + quercetina)**: submetidos a choque térmico antes de receberem glicose e quercetina.

## TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA

Os testes de tolerância à insulina foram realizados com animais mantidos em jejum de 12 horas. Foi utilizada *Insulina Humalog Lispro – Lilly* 100 UI/mL, preparada em PBS (NaCl (136,8 mM), KCl (2,7 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,9 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6,4 mM)) 1UI/mL, e aplicada na concentração de 1UI/kg de peso corporal, por via intraperitoneal. Os volumes administrados foram de 125 µL para cada 100 g de peso corporal.

O valor da glicemia em jejum foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos (*tempo zero*) e novamente nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose. As medidas da glicemia foram feitas com sangue total em punção na parte distal da cauda dos animais, usando aparelhos de leitura glicêmica capilar, glicosímetro, *Optium Xceed da Abbott*.

Nestes experimentos, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- ❖ Grupo **C (controle)**: animais mantidos com temperatura normal receberam PBS.
- ❖ Grupo **INS (insulina)**: animais mantidos com temperatura normal receberam insulina.
- ❖ Grupo **HS (*heat shock*)**: animais submetidos a choque térmico antes de receber PBS.
- ❖ Grupo **HS-INS (*heat shock* + insulina)**: animais submetidos a choque térmico antes de receberam insulina.

## PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA CAPTAÇÃO DE 2-DESÓXI-GLICOSE RADIOMARCADA

Os estudos relativos à captação de glicose foram realizados com **2-desóxi-D-glicose (2-DG)** triciada {2-[1,2-<sup>3</sup>H (N)]-desóxi-D-glicose, radioatividade específica: 8 Ci/mmol, 1 mCi/mL; N = nominalmente marcada, isto é, especificamente nos 2 hidrogênios do C-2; 1,57 µCi/100 g de rato. Estes estudos foram destinados à investigação da captação de glicose pelos tecidos em três protocolos experimentais:

- Protocolo experimental cujos animais foram submetidos a uma sessão de **choque térmico, e 12 horas após,** receberam injeção de [3H]2-DG com/sem glicose fria.
- Protocolo experimental cujos animais receberam **administração exógena de HSP70** (HSP70-A1) por via endovenosa, e, 12 horas após, receberam injeção de [3H]2-DG com/sem glicose fria.
- Protocolo experimental com **músculo solear incubado**, na presença de insulina, ADP e soro.

## PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA CAPTAÇÃO DE GLICOSE APÓS O CHOQUE TÉRMICO

Transcorridas **12 horas** desde a realização do choque térmico, os animais foram organizados nos seguintes grupos experimentais com os quais se procedeu como abaixo descrito:

- ❖ Grupo **C (controle)**: administração de 2-desóxi-D-glicose 2-[1,2-<sup>3</sup>H(N)], à dose de 0,157 µCi/100 g de rato diluído em PBS, via intraperitoneal.

- ❖ Grupo **GLI (glicose)**: administração de 2-desóxi-D-glicose 2-[1,2-<sup>3</sup>H(N)], à dose de 0,157 µCi/100 g de rato diluído em PBS, acrescidas de glicose a uma concentração final de 80% (m/v), via intraperitoneal.
  
- ❖ Grupo **HS (heat shock)**: grupo submetido a choque térmico 12 horas antes da administração de 2-desóxi-D-glicose 2-[1,2-<sup>3</sup>H(N)], à dose de 0,157 µCi/100 g de rato diluído em PBS, via intraperitoneal.
  
- ❖ Grupo **HS-GLI (heat shock + glicose)**: grupo submetido a choque térmico 12 horas antes da administração de 2-desóxi-D-glicose 2-[1,2-<sup>3</sup>H(N)], à dose de 0,157 µCi/100 g de rato diluído em PBS, acrescidas de glicose a uma concentração final de 80% (m/v), via intraperitoneal.

Os volumes administrados foram de 125 µL para cada 100 g de peso corporal.

#### **PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA CAPTAÇÃO DE GLICOSE APÓS ADMINISTRAÇÃO DE HSP70 (HSPA1A):**

Para estes experimentos, foi utilizada HSP70 (HSP70A1A humana recombinante, 99,8% homóloga à de rato, *Enzo Life Sciences*), injetada via endovenosa na veia dorsal superficial do pênis, com os animais anestesiados com xilazina 10 mg.kg<sup>-1</sup> (0,05 mL de xilazina 2% para 100).

Para o cálculo da dose de HSP70 a ser injetada, foram levadas em conta as seguintes considerações. Primeiramente, calculou-se a dose de HSP70 (HSPA1A) necessária para se atingir uma concentração de HSP70 plasmática de 1 ng/mL (13.9 pM). Considerando-se que um rato tem (0,06.P+0,77) mL de sangue (LEE & BLAFOX, 1985), sendo **P** o seu peso em gramas, um rato de 250 g terá cerca de 0,06.250+0,77 = 15,77

mL de sangue. Após transcorridas **12 horas** desde a administração de HSP70, os animais foram submetidos a testes de captação de 2-DG. Neste protocolo experimental, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- ❖ Grupo **C (controle)**: Administração de 2-desóxi-D-glicose 2-[1,2-<sup>3</sup>H(N)] na dose de 0,157 µCi/100 g de rato diluído em PBS, via intraperitoneal.
  
- ❖ Grupo **GLI (glicose)**: Administração de 2-desóxi-D-glicose 2-[1,2-<sup>3</sup>H(N)] na dose de 0,157 µCi/100 g de rato diluído em PBS, acrescidas de glicose a uma concentração final de 80% (m/v), via intraperitoneal.
  
- ❖ Grupo **HSP1 (HSP70 1ng)**: grupo submetido à administração de HSP70 (HSPA1A) na dose necessária para se atingir uma concentração de HSP70 de 1 ng/mL (13.9 pM), 12 horas antes da injeção de 2-desóxi-D-glicose 2-[1,2-<sup>3</sup>H(N)] na dose de 0,157 µCi/100 g de rato diluído em PBS, via intraperitoneal.
  
- ❖ Grupo **HSP1 GLI (HSP70 1ng + glicose)**: grupo submetido à administração de HSP70 (HSPA1A) na dose necessária para se atingir uma concentração de HSP70 de 1 ng/mL (13.9 pM), 12 horas antes da injeção de 2-desóxi-D-glicose 2-[1,2-<sup>3</sup>H(N)] na dose de 0,157 µCi/100 g de rato diluído em PBS, acrescidas de glicose a uma concentração final de 80% (m/v), via intraperitoneal.

Os volumes administrados foram de 125 µL para cada 100 g de peso corporal.

Para leitura da presença de glicose radiomarcada no plasma, este foi aplicado diretamente (200 µL) no flaconete e completado com líquido de cintilação *Perkin Elmer*. Amostras foram retiradas para medida das concentrações plasmáticas de glicose, permitindo o cálculo da radioatividade específica, detalhado no item “Cálculo e Equações”).

Os eritrócitos foram obtidos a fresco a partir do sangue anticoagulado com heparina, HEPAMAX – 5000 UI/mL na concentração de 30 UI/mL de sangue e Fluoreto de Sódio (NaF) 4mg/mL de sangue. Após lavagem da papa de hemácias com PBS [NaCl (136,8 mM), KCl (2,7 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,9 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6,4 mM)], um volume conhecido de papa de hemácias foi hemolisado em água na proporção 1:3. O volume total foi centrifugado 16.000 x g por um minuto, e do sobrenadante, foram coletados 200 µL completando-se o flaconete com líquido de cintilação *Perkin Elmer*. Os tecidos foram homogeneizados na proporção 1:5 com água MILLI-Q na presença de NaF (4 mg/g de tecido, para bloqueio da utilização de glicose durante as preparações). O coração foi exsanguinado e lavado com PBS [NaCl (136,8 mM), KCl (2,7 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,9 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6,4 mM)], e os intestinos foram limpos com solução PBS antes de serem homogeneizados. O volume total dos homogenatos foi centrifugado 16.000 x g por um minuto. Do sobrenadante, foram coletados 200 µL completando-se com líquido de cintilação *Perkin Elmer*, no flaconete.

A radioatividade foi lida em contador LKB Wallac 1209 *RACKBETA liquid scintillation counter* FLEXI-VIAL, em dpm. Para efeitos comparativos, 1 µCi = 2,22 x 10<sup>6</sup> dpm.

## **PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA CAPTAÇÃO DE GLICOSE POR MÚSCULO ESQUELÉTICO SOLEAR INCUBADO**

Para avaliação dos efeitos da HSP70 sobre a captação de glicose pelo músculo esquelético na presença de insulina, foram incubadas fatias longitudinais de músculo solear de ratos não tratados e mantidos em jejum de 12 horas .

Os músculos soleares foram repartidos longitudinalmente à metade e, assim, de cada animal pôde-se utilizar quatro fatias/porções ( de 60 - 100 mg cada) a serem ensaiadas. Os animais, dos quais foram obtidos os tecidos, foram mortos por decapitação pela manhã (8 h), após jejum de 12 horas, tendo sido submetidos à excisão cirúrgica dos músculos de interesse.

Imediatamente após a excisão dos tecidos, estes foram equilibrados em banho metabólico a 37 °C em frascos de Warburg modificados (com poço de vidro central com capacidade para 500 µL) por 30 minutos em solução de HANKS constituída de NaCl (137,0 mM), KCl (3,0 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,3 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5 mM), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,8 mM), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (1,3 mM), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,8 mM), NaHCO<sub>3</sub> (4,2 mM) e gaseificada com carbogênio (5% de CO<sub>2</sub>/95% de O<sub>2</sub>).

Após a fase de equilíbrio, foram feitas as seguintes adições às preparações:

- Soro autólogo dialisado (*cutoff* de 16 kDa)
- Insulina a 10 µUI/ml (74 pM)
- ADP (1 mM)
- HSP72 (HSPA1A) recombinante nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 100 ou 500 ng/ml (equivalentes a 70 pM, 140 pM, 280 pM, 700 pM ou 1400 pM, respectivamente) e
- Glicose fria diferentes concentrações de 2,75, 5,5 e 11,0 mM, previamente misturadas com 0,41 µCi/ml de 2DG [U-<sup>14</sup>C] (atividade específica original: 310 µCi /mmol).

Nas incubações dos tecidos **controle, em que foram omitidas ou a insulina ou HSP72 ou ADP ou a glicose fria**, esses reagentes foram substituídos por volumes equivalentes de solução de Hanks.

Os ensaios tiveram início com a adição da mistura de glicose e 2-DG, sendo que as preparações foram mantidas sob agitação a 37 °C por 30 minutos, período em que se inicia (conforme experimentos-piloto) o platô máximo de captação de 2-DG nas condições experimentais aqui descritas.

O ADP foi adicionado aos meios de incubação tendo em vista que, durante o ciclo de ancoragem e liberação de proteínas clientes no sítio de ligação de proteínas/substratos (SBD) da chaperona HSP72, o ATP promove a liberação dos peptídeos, e o ADP, sua manutenção no sítio ativo. Por esta razão, em estudos de ligação de HSP70 a proteínas clientes, emprega-se ADP (BECKER et al., 2002).

## **MORTE DOS ANIMAIS**

Os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos, para posterior realização das análises. O método escolhido para eutanásia baseia-se no fato deste ser um método eficaz que produz mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos. Considerando-se a necessidade de realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação. O grau de severidade para este procedimento é considerado sem recuperação.

Os animais foram decapitados em ambiente exclusivamente destinado à morte dos animais, com exaustão e higienização completa de todo o material entre a morte de um animal e outro. A decapitação foi efetuada pelo pesquisador mais experiente, dentre os pesquisadores do grupo, para que o procedimento fosse rápido, com o mínimo de estresse possível para os animais.

Após a morte, os animais foram dissecados para coleta dos tecidos e, para o descarte, foram colocados em sacos plásticos identificados com o símbolo de risco biológico e congelados em freezer (-20 °C) destinado para este objetivo, no próprio Laboratório de Fisiologia Celular - FisCel da UFRGS e/ou no Laboratório de Ensaios Biológicos - LEBio da UNIJUÍ. Seguindo o cronograma semanal de cada Laboratório/Instituição, este material biológico foi encaminhado ao serviço de coleta por empresa licitada pela UFRGS, para, então, ter destinação final dos resíduos (autoclavagem e aterro sanitário). No caso dos experimentos realizados no LEBio - UNIJUÍ, os restos de tecidos e carcaças de animais também foram acondicionados em sacos plásticos identificados com o símbolo de risco biológico e congelados em freezer (-20 °C) até serem entregues ao serviço terceirizado de coleta de resíduos da UNIJUÍ, realizado pela empresa Stericycle, de Santa Maria-RS.



## PLASMA e ANÁLISES BIOQUÍMICAS

O plasma utilizado nas análises bioquímicas foi preparado a partir de amostras de sangue coletadas em tubos individuais preparados conforme as especificações dos manuais dos respectivos kits para análise de glicose, HSP70, insulina e ácidos graxos, conforme descrito abaixo.

O sangue troncular foi coletado em amostras distintas conforme as especificações exigidas pelos fabricantes, sendo centrifugado a  $1400 \times g$  por 10 minutos à temperatura ambiente (ou sob refrigeração, dependendo do caso) em centrífuga hematológica ou microcentrífuga, dependendo da necessidade. A leitura e preparo das amostras seguiram os protocolos dos diferentes kits de análises bioquímicas utilizados.

• **DOSAGEM DE HSP70/72**, Kit *Enzo Life Sciences* (Imunoensaio Enzimático) e de **HSC70/HSP73**, Kit *StressMarq Biosciences Inc.* (Imunoensaio Enzimático): o sangue foi coletado em ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) na concentração de 2mg/mL de sangue. Plasma armazenado com inibidores de proteases Leupeptina (Sigma L8511, hemissulfato, FW = 475,59 g/mol), [2 µg/mL = 4,2 µM]; Aprotinina (Sigma A1153, liofilizada; FW = 6511 g/mol) [2 µg/mL = 0,31 µM]; TLCK (cloridrato de N-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona; Sigma T7254; FW = 369,31 g/mol). [1,85 mg/mL = 5 mM]; PMSF (Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila; Sigma P7626; FW= 174,19 g/mol) [1,74 mg/mL = 100 mM]. Mensurada por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* – ELISA (450 nm).

• **DOSAGEM DE INSULINA**: Kit *Cayman Chemical*. (Imunoensaio Enzimático), sangue coletado em heparina, HEPAMAX – 5000 Ui/mL na concentração de 30Ui/mL de sangue. Plasma armazenado com a adição de coquetel inibidor de hemólise (EDTA 56,52 mg, Fenantrolina 16,25 mg) preparado em tampão de ensaio enzimático, segundo

instruções do fabricante, usado na proporção 10 µL/mL de plasma, e foi mensurada por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* – ELISA (405 nm).

• **DOSAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES:** Kit *BioAssay Systems* (Colorimétrico Quantitativo), sangue coletado em EDTA na concentração de 2mg/mL de sangue. Plasma armazenado com inibidores de proteases Leupeptina (Sigma L8511, hemissulfato, FW = 475,59 g/mol), [2 µg/mL = 4,2 µM]; Aprotinina (Sigma A1153, liofilizada; FW = 6511 g/mol) [2 µg/mL = 0,31 µM]; TLCK (cloridrato de N-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona; Sigma T7254; FW = 369,31 g/mol). [1,85 mg/mL = 5 mM]; PMSF (Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila; Sigma P7626; FW= 174,19 g/mol) [1,74 mg/mL = 100 mM]. Mensurada por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* – ELISA (570 nm).

• **DOSAGEM DE GLICOSE:** Kit *Glicose Liquiform Labtest*. (Imunoensaio Enzimático), sangue coletado em heparina, HEPAMAX – 5000 Ui/mL na concentração de 30UI/mL de sangue e Fluoreto (NaF) 4mg/mL de sangue. Mensurada por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* – ELISA (520nm).

## COLETA DOS TECIDOS

Após a morte, os animais foram dissecados e procedeu-se à coleta dos tecidos de interesse (pâncreas, tecido adiposo, fígado e músculos). Nos experimentos com músculo esquelético, os mesmos (gastrocnêmio e solear) foram coletados das duas patas traseiras dos animais. Todos os tecidos foram retirados no tempo máximo de 03 (três) minutos pós-morte e imediatamente congelados em nitrogênio líquido com o auxílio de *freeze-clamp*, e, em seguida, acondicionados em freezer com temperatura de -20°C.

Exceções foram feitas apenas quando os tecidos musculares foram destinados a testes *in vitro* de incubação com HSP70 e captação de glicose.

Para as análises da captação de glicose radiomarcada, foram coletados outros tecidos, como o tecido adiposo epididimal, adiposo retroperitoneal, adiposo marrom, coração, encéfalo, hipotálamo, rim, jejuno, íleo, cólon, linfonodos mesentéricos, baço, timo e eritrócitos, além dos tecidos já listados anteriormente.

### **COIMUNOPRECIPITAÇÃO HSP-INSULINA**

Para os ensaios de coimunoprecipitação, amostras de plasmas de ratos (tratados sob diversas condições experimentais) ou da proteína HSP70 (HSPA1A recombinante, *Enzo Life Sciences*) na concentração final de 1 ng/mL, foram incubadas com quantidades equimolares de insulina fria ou biotinizada (Sigma). Para os estudos de competição, amostras de plasma, HSP70 (1,38  $\mu$ M) e insulina biotinizada (1,38  $\mu$ M) foram incubadas em 125  $\mu$ L finais em soro fetal bovino (*Cripion*) dialisado (*cutoff* 12-16 kDa) e concentrações crescentes de insulina regular (HI0210, Lilly) cujas concentrações finais no ensaio foram de 0, 0,69, 1,38, 2,76, 5,50, 11,04 e 69  $\mu$ M que equivalem, em termos de quantidade de proteína por tudo a, respectivamente, 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 50,0  $\mu$ g, pelo período de duas horas a 37 °C em banho-maria com agitação. Para o ensaio controle, não se adicionou insulina regular (HI0210, Lilly); para o controle negativo, (P1) usou-se apenas 125  $\mu$ L de soro fetal bovino (*Cripion*) dialisado (*cutoff* 12-16 kDa); e para controle positivo (P2), o ensaio foi igual ao controle, porém, sem a adição de HSP70. Informações apresentadas esquematicamente no Quadro 01 abaixo.

	<b>Insulina Biot. (μL)</b>	<b>Insulina Regular (volume e quantidade)</b>	<b>Soro Dialisado (μL)</b>	<b>HSP72</b>	<b>PBS</b>
CONTROLE	10	-	95	0,6 ng	10
0,5 μg	10	10 – [0,5 μg]	95	0,6 ng	-
1 μg	10	10 – [1 μg]	95	0,6 ng	-
2 μg	10	10 – [2 μg]	95	0,6 ng	-
4 μg	10	10 – [4 μg]	95	0,6 ng	-
8 μg	10	10 – [8 μg]	95	0,6 ng	-
50 μg	10	10 – [50 μg]	95	0,6 ng	-
P1 (-)	-	-	125	-	-
P2 (+)	10	-	95	-	10

**Tabela 01: Representação esquemática de ensaios para imunoprecipitação.** Representação dos ensaios de imunoprecipitação de HSP70 (HSP70-A1 recombinante) Enzo Life Sciences, insulina biotinilada (I2258, Sigma), soro fetal bovino (Cripion) dialisado, (cutoff 12-16 kDa) e concentrações distintas de insulina regular (HI0210, Lilly).

Antes das adições dos anticorpos destinados às reações imunológicas e imunoprecipitações, os meios de incubação foram pré-clarificados com soro pré-imunizado de camundongo (nas imunoprecipitações de plasmas destinados à detecção de insulina ou HSP70) ou com anticorpo anti-HSP70 (2 μg/mL), quando as amostras foram destinadas à competição entre insulina fria e marcada com biotina. Nos experimentos com plasmas, as amostras foram imunoprecipitadas de duas maneiras distintas: com anticorpo anti-insulina, lavadas e submetidas à eletroforese nativa (não redutora e não desnaturante) e immunoblot contra HSP72/HSP73 ou com anticorpo anti-HSP72/HSP73, lavadas e submetidas à eletroforese nativa (não redutora e não desnaturante) e immunoblot contra insulina. Para as eletroforeses nativas, o tampão de amostra foi constituído de Tris-HCl (60 mM, pH 6,8), glicerol (2% v/v) e azul de bromofenol (0,01%, m/v). Neste caso, as amostras não foram fervidas para que fossem preservadas as interações fracas não covalentes que pudessem existir fisiologicamente. Nos experimentos de competição entre as insulinas (biotinilada e fria), a reação imunológica foi realizada com anticorpo anti-HSP72/HSP73 sendo que a detecção das proteínas, após fervura (5 min) e eletroforese não redutora e de estringência branda (com detergentes pouco estringentes), foi realizada com estreptavidina ultrasensível marcada com peroxidase de raiz forte. As visualizações foram efetuadas com reagente ECL Prime, como descrito acima.

Após incubação, 375 µL de tampão de imunoprecipitação não desnaturante – TIP (Nonidet P-40, 1%, 1mL, Desoxicolato, 0,5%, 500mg, NaCl, 150 mM, 876,6 mg e Tris-HCl, 10 mM pH 7.4, 121 mg, (q.s.p. 100 mL de água MilliQ acrescida de albumina sérica bovina (A2153, Sigma) a 1 mg/mL)) foi adicionado aos ensaios, juntamente com 10 µL de Proteína A/G Agarose e soro pré imune (camundongo) à concentração final de 2 µg/mL. Incubados por 90 minutos a 4 °C sob agitação para clarificação da mistura.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15000 x g por trinta segundos, e o sobrenadante utilizado para o procedimento seguinte, onde se adicionou 10 µL de anticorpo anti-HSP (2 µg/mL final), preparado através de diluição 1:10 (H5147, BRM22 - Sigma), com exceção do controle positivo P2, incubados por mais 12 horas a 4°C com agitação. Transcorridas 12 horas, foram adicionadas 10 µL de proteína A/G Agarose (em aproximadamente 500 µL de volume por amostra), e incubadas por mais 90 minutos a 4 °C com agitação.

Finalmente, o material foi centrifugado a 15.000 x g por trinta segundos, e lavado três vezes com 1 mL de SDS-TIP (SDS a 0,1% (1 mg de SDS/mL de tampão de imunoprecipitação (10 mg de SDS sólido para 10 mL de TIP)) e uma vez com 1 mL de PBS (NaCl (136,8 mM), KCl (2,7 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,9 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6,4 mM)), os pellets foram fervidos em tampão de amostra não redutor (H<sub>2</sub>O, 12 mL; Tris HCl 0,5 M pH 6,8, 10 mL; SDS 20%, 8 mL; Glicerol, 8 mL; Azul de Bromofenol, 1 mg/mL, 2 mL). A eletroforese para estas amostras foram feitas em gel de agarose em gradientes de 20% (H<sub>2</sub>O, 4,1 mL; Tris HCl 1,4 M pH 8,8, 2,5 mL; SDS 10%, 100 µL; Bis-acrilamida 30% 6,6 mL; APS, 50 µL; TEMED, 5 µL), 10% (H<sub>2</sub>O, 4,1 mL; Tris HCl 1,4 M pH 8,8, 2,5 mL; SDS 10%, 100 µL; Bis-acrilamida 30% 3,3 mL; APS, 50 µL; TEMED, 5 µL) e 5% (H<sub>2</sub>O, 4,1 mL; Tris HCl 1,4 M pH 8,8, 2,5 mL; SDS 10%, 100 µL; Bis-acrilamida 30% 1,65 mL; APS, 50 µL; TEMED, 5 µL), o gel de entrada foi realizado a 4% (H<sub>2</sub>O, 3,1 mL; Tris HCl 0,5 M pH 6,8, 1,25 mL; SDS 10%, 50 µL; Bis-acrilamida 30% 665 µL; APS, 25 µL; TEMED, 10 µL). A corrida foi realizada a 5 mA por gel até as amostras entrarem no gel de corrida sendo que, em seguida, aplicou-se uma corrente de 10 mA por gel até saída do corante. Após eletroforese, realizaram-se eletrotransferência (100V) e revelação do *Western Blotting* para insulina, anticorpo anti-insulina (I8510, Sigma), na concentração 1:1.000, e segundo anticorpo, anti-IgG conjugado, HRP-peroxidase (A7289), na concentração 1:10.000. A revelação das

membranas foi realizada com ECL Prime (GE) e as imagens foram registradas por sistema de aquisição e análise de imagens UV-visível/quimiluminescência, ImageQuant 350 com lentes motorizadas e focagem automática GE-HealthCare e software Image Master TL 7.0.

## **INTERAÇÃO TEÓRICA DA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70 (HSP70) COM INSULINA**

### **MODELAGEM MOLECULAR E ANCORAGEM**

O modelo molecular da HSP70 foi construído usando a sequência de aminoácidos da proteína humana (VERSÃO AAA02807.1 GI: 292160); foram utilizadas como moldes as entradas 3C7N (estrutura da máquina de troca de nucleotídeos HSP110:HSC70; SCHUERMAN et al, 2008) e 3DPO (acoplamento alostérico na DnaK; LIEBSCHER & ROUJEINIKOVA, 2008), do Protein Data Bank (PDB). O software MODELLER v9.8 (SÁNCHEZ & SALI, 2000) foi utilizado para gerar os arquivos “.pdb”. Foi selecionado o melhor entre cinquenta modelos gerados com base nos parâmetros fornecidos pelo servidor PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>) e seus plots PROCHECK (LASKOWSKI, 2009; LASKOWSKI ET AL, 1993). O presente modelo de HSP70 compreende o domínio de ligação de nucleotídeos (**NBD**), o domínio de ligação ao substrato (**SBD**) e o domínio C-terminal. A fim de verificar como a interação de HSP70 com insulina poderia ocorrer, foram utilizados a entrada da base PDB “1ZEI\_A” (para a insulina, WHITTINGHAM JL et al, 1998) e o SBD de nosso modelo nos experimentos de ancoragem molecular. Estes experimentos foram conduzidos no servidor de ancoragem ClusPro 2,0 (<http://cluspro.bu.edu/>) [KOZAKOV et al., 2010; KOZAKOV et al., 2006; COMEAU et al., 2004a; COMEAU et al., 2004b]. As ilustrações moleculares e respectivas análises foram realizadas com o pacote de UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) [PETTERSEN et al., 2004].

## CÁLCULO DA DINÂMICA MOLECULAR (MD)

As melhores soluções matemáticas para a ancoragem do complexo insulina-SBD e os sistemas de HSP70 livre foram submetidos à simulação de dinâmica molecular (MD) com o software GROMACS 4 suite (HESS et al., 2008) utilizando um campo de força GROMOS96 53a1 (um campo de força biomolecular com base na entalpia livre de hidratação e solvatação; OOSTENBRINK et al., 2004). Os sistemas acima foram solvatados em sistemas triclinicos usando condições de limites periódicos, utilizando-se o modelo de comportamento da água do tipo SPC (BERENDSEN et al., 1987). Contraíons foram adicionados para neutralizar o sistema. O protocolo de MD foi construído com base em estudos anteriores (VERLI & GUIMARÃES, 2004; POL-FACHIN & VERLI, 2012). O método Lincs (HESS et al. 1997) foi aplicado para restringir os comprimentos das ligações covalentes, permitindo um intervalo de integração de 2 fs após uma minimização da energia inicial utilizando-se o algoritmo Steepest Descents. As possíveis interações eletrostáticas foram calculadas pelo método da malha particular de Ewald (DARDEN et al., 1993). A temperatura e a pressão foram retidas em níveis constantes mantendo-se as proteínas acopláveis, os íons e o solvente em equilíbrio com a temperatura e a pressão externa do banho através, respectivamente, das seguintes constantes de acoplamento:  $\tau = 0,1$  e  $0,5$  ps (BERENDSEN et al., 1984). A constante dielétrica foi assumida como  $\epsilon = 1$ , e a temperatura de referência foi ajustada a 310 K (37 °C). O sistema foi aquecido lentamente de 50 K (-223 °C) a 310 K (37 °C), permitindo termalização progressiva. A simulação foi, então, realizada até 75 ns, sem restrição, e o valor de referência de  $3,5 \text{ \AA}$  entre átomos pesados foi assumido como sendo de uma ligação de hidrogênio, enquanto que um ângulo limite de  $30^\circ$  foi utilizado entre o complexo hidrogênio doador-receptor (HESS et al., 2008). Os resultados relativos à predição 1A são fruto da parceria entre o nosso laboratório (Laboratório de Fisiologia Celular - da UFRGS) e o Laboratório 32 do Departamento de Bioquímica da UFRGS, coordenado pelo Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira.

## CÁLCULOS E EQUAÇÕES

### CÁLCULOS DOS PESOS MOLECULARES DOS COIMUNOPRECIPITADOS DE INSULINA BIOTINILADA E HSP70

Os pesos moleculares dos coimunoprecipitados de insulina biotinilada e HSP70 foram calculados com base no logaritmo dos pesos moleculares dos padrões coloridos (ou biotinilados) empregados, conforme mostrado na figura 2abaixo.

run length on PowerPoint (in)	run length (in)	apparent MW <sub>r</sub> (Da)	ln MW <sub>r</sub>	log MW <sub>r</sub>
-2.06	0.00	8000	8.987	3.903
-1.70	0.36	12000	9.393	4.079
-1.37	0.69	20000	9.903	4.301
-0.76	1.30	45000	10.714	4.653
0.09	2.15	60000	11.002	4.778
1.16	3.22	100000	11.513	5.000
2.02	4.08	220000	12.301	5.342

Resultados de "y" a partir da equação linear:

distance x (in)	x converted	"y" = log MW <sub>r</sub>	MW <sub>r</sub> = 10 <sup>y</sup>	MW <sub>r</sub> (kDa)
2.04	4.10	5.3735	236309	236
1.92	3.98	5.3340	215786	216

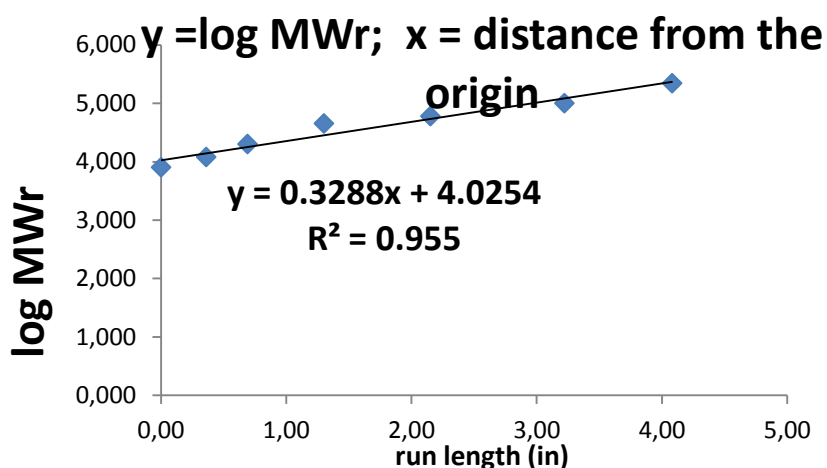


Figura 2. Cálculos relativos aos pesos moleculares dos ensaios de coimunoprecipitação de insulina biotinilada e HSP70.



## MODELO DE AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE – HOMA-IR:

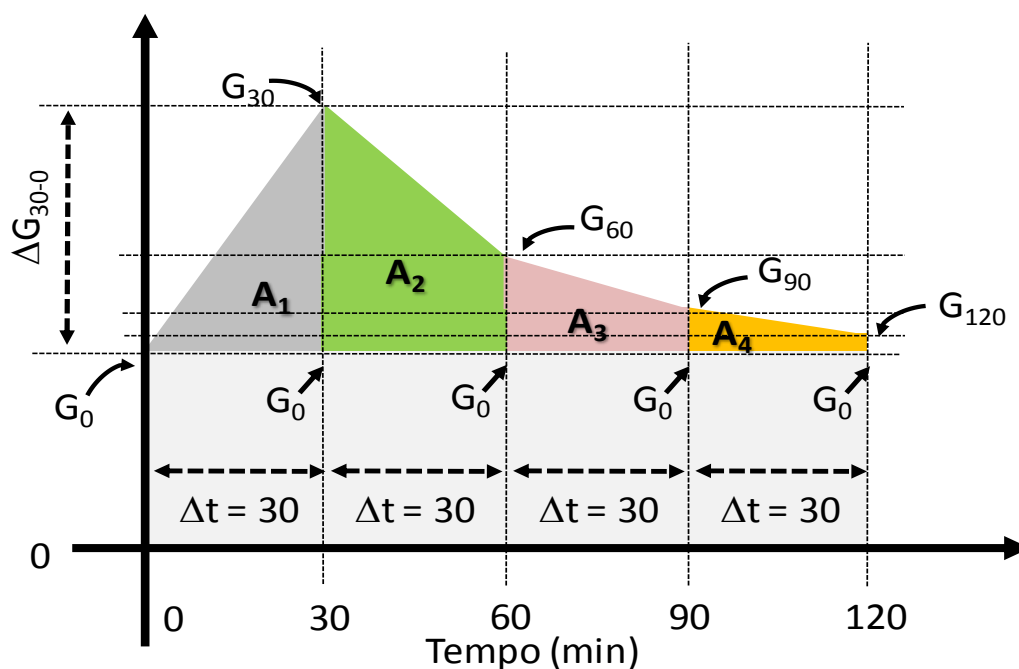
Foi utilizada análise da resistência à insulina pelo método do HOMA - *Homoestasis Model Assessment* (MATTHEWS et al., 1985). A equação para a resistência à insulina, leva em consideração uma amostra de sangue de jejum, e foi derivada pela utilização do produto da insulinemia X glicemia, dividido por uma constante:

$$HOMA - IR = \frac{\textit{glicemia} \times \textit{insulinemia}}{22,5}$$

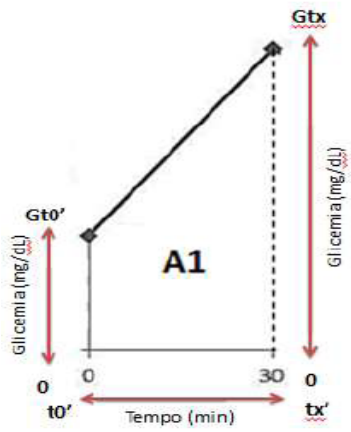
Nesta equação, a glicemia é dada em mmol/L e a insulinemia, em  $\mu\text{U/mL}$ . A equação utilizada para transformação de mg/dL utilizada foi: valor da glicemia em mg/dl  $\div 18,06$  (WALLACE et al., 2004)

## ÁREA INCREMENTAL SOB A CURVA – IAUC

Para a análise da área incremental sob a curva, a mesma foi calculada geometricamente através da aplicação da regra trapezoidal, excluindo-se do cálculo as áreas abaixo da linha de jejum (USA FAO, 1997).



**Figura 3.** Representação esquemática das formas geométricas, base para os cálculos da área incremental sob a curva.  $IAUC^* = A_1 + A_2 + A_3 + A_4 = \{[30 \cdot (G_{30} + G_{60} + G_{90})] + (15 \cdot G_{120}) - (105 \cdot G_0)\}$  (em min.mg/dL). Considerando o peso molecular da glicose, 180,16 mg/mmol, dividindo a IAUC (em min.mg/dL) por 18,016, obtém-se o valor em min.mM.



$$A = \frac{(B+b) \times h}{2} = \frac{(\Delta G^{\text{inicial}} + \Delta G^{\text{final}}) \times \Delta t}{2}$$

Onde,  $\Delta G$  = Variação de Glicemia no intervalo de Tempo  $\Delta t$   
 $t0'$  = Tempo Inicial  
 $tx$  = Tempo Final (Ex.:  $t30'$ , tempo 30 min)  
 $\Delta t$  = Intervalo de tempo da tomada

$$A1 = \frac{(G0 + G30) \times 30}{2}$$

$$A2 = \frac{(G30 + G60) \times 30}{2}$$

$$A3 = \frac{(G60 + G90) \times 30}{2}$$

$$A4 = \frac{(G90 + G120) \times 30}{2}$$

$$IAUC = \sum A1 + A2 + A3 + A4$$

Figura 4. Representação ilustrativa da aplicação equacional no trapézio para os cálculos da área incremental sob a curva.

## CÁLCULO DO VOLUME TOTAL DE SANGUE DOS RATOS PARA DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE ANTICORPO ANTI-HSP70 OU HSP70 A SER INJETADO

Para determinação do volume de anti-HSP70 (3A3 da Santa Cruz, sc-32239) ou HSP70 (HSP70-A1, Enzo Life Sciences) a ser injetado em cada rato, usou-se a equação de Lee (1985):

$$\text{volume de sangue} = (0,06 \times p) + 0,77$$

Assim, 1 rato tem  $(0,06.P+0,77)$  mL de sangue (LEE & BLAUFOX,1985), sendo **P** o peso em gramas. Um rato de 250 g terá cerca de  $0,06.250+0,77 = 15,77$  mL de sangue.

A construção do ensaio experimental partiu do pressuposto que a concentração máxima de HSP70, conforme dados prévios de nosso laboratório, é de 10 ng/mL; portanto, num rato de 250 g, teremos 2,19 picomols totais de HSP70 circulantes em uma situação de estresse. Assim, uma fórmula geral pode ser dada por:  $\text{HSP70} = 10 \text{ ng/mL} \times (0,06.P+0,77) \times 1000 \text{ pmol/nmol} / 72000 \text{ ng/nmol} = (600.P+7700)/72000 \text{ pmol} = (6.P+77)/720 \text{ pmol}$  de HSP70 por rato de peso **P** (em gramas) para uma concentração de 10 ng/mL de HSP72 circulante.

- DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE HSP70 A SER INJETADO

A dose de HSP72 (HSP70-A1, Enzo Life Sciences) a ser injetada foi calculada considerando-se a relação de volume sanguíneo pelo peso corpóreo descrita em Lee & Blaufox (1985), calculada para que a concentração de HSP72 injetada fosse de 1 ng/mL (13.9 pM),  $x=(0,06.P+0,77)$  mL  $\times$  1 ng/mL = 15,8 ng por rato, assumindo-se que o rato tenha 250 g. Nos casos de peso maior, multiplicou-se esta dose pela quantidade de peso maior que 250 g (por exemplo: 300 g, multiplicar essa dose de 15,8 ng por  $300/250 = 1,2$ , ou seja, esse rato de 300 g deve receber uma dose de 18,96 ng). Foram injetadas endovenosamente doses de HSP72 de modo que a concentração plasmática deveria atingir 1 ng/mL (13.9 pM).

## DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE ANTICORPO ANTI-HSP70 A SER INJETADO

O anticorpo anti-HSP70 utilizado (clone 3A3 da Santa Cruz, sc-32239) reconhece ambas as principais formas de HSP70 (constitutiva e induzível), e vem formulado a 0,2 mg/mL de IgG1 = 0,2 ug/uL (1 ug de IgG em 5 uL). Considerando-se que as IgG possuem peso molecular de aproximadamente 150 kDa (150.000  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ), 1 ug de IgG contém aproximadamente 6,67 pmol de IgG, ou seja, em 5 uL (1 ug) temos 6,67 pmol de IgG anti-HSP70, isto é, 1,3 pmol/uL. Entretanto, as IgG apresentam dois sítios de ligação a antígenos (Fab'); portanto, com essas quantidades, tem-se uma capacidade de ligação de 2,667 pmol/uL de anticorpo a 0,2 mg/mL.

Desta forma, foram utilizadas quantidades de anticorpo suficientes para neutralizar (supondo-se que estequiometricamente) todo o conteúdo de HSP70 presente no sangue circulante, utilizando-se o seguinte cálculo para determinação do volume a ser injetado, via intraperitoneal:  **$(100 \cdot \text{volume sangue})/960,48$** .

Para injeção do anticorpo, o volume obtido a partir do cálculo anterior foi complementado com PBS até o volume total de 200 $\mu\text{L}$ .

## CÁLCULO DA RADIOATIVIDADE ESPECÍFICA

Para o cálculo da radioatividade específica, utilizou-se a seguinte equação:  **$[(\text{dpm/mL de radioatividade plasmática}) / (\mu\text{mol/mL de glicose plasmática})]$** .

Os resultados de radioatividade específica de cada animal (em dpm/ $\mu\text{mol}$ ) foram utilizados para calcular a quantidade de glicose (em  $\mu\text{mols}$ ) captada em cada tecido analisado. A radioatividade foi lida em contador LKB Wallac 1209 RACKBETA liquid scintillation counter FLEXI-VIAL, em dpm. Para efeitos comparativos, 1  $\mu\text{Ci}$  = 2,22 x 10<sup>6</sup> dpm.

# ANÁLISE ESTATÍSTICA

---

Para a análise estatística foram realizados diversos testes como: Análise de Variância (ANOVA) de Medidas Repetidas, seguido do teste de Tukey para análise das glicemias ao longo dos testes de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina; Análise de Variância de uma via seguido do Teste de Tukey, para análise e 3 ou mais variáveis/grupos; Análise de Variância de duas vias, fator 1: 'tempo experimental', fator 2: tratamento 'C vs HS', seguido de teste de Tukey para dados relativos à insulinemia, ácidos graxos livres e HSP72, HSP73 e HSP70 total em diferentes tempos experimentais pós-choque térmico; Teste *t* de Student independente para a comparação entre os grupos Controle (C) e Choque térmico (HS). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças foram consideradas significativas para um nível de significância de, pelo menos, 5% ( $p < 0,05$ ). O tratamento estatístico foi desenvolvido no programa estatístico GraphPad 3.0 InStat DTCG e programa IBM SPSS Statistics 20.0.0.

## **TRANSFORMAÇÃO DE DADOS NÃO PARAMÉTRICOS EM PARAMÉTRICOS:**

É necessária a transformação de dados a serem submetidos a ANOVA para a obtenção de homocedasticidade (homogeneidade de variância) para que sejam avaliados os efeitos de determinados fatores sobre a abundância de uma população de dados. Porém, quando os dados apresentados aparecem com uma alta frequência de

valores iguais a *zero*, acrescenta-se uma constante (0,5) a cada um dos dados (YAMAMURA, 1999). Os dados assumem um novo valor segundo a fórmula:

$$\mathit{valor} = \sqrt{x + 0,5}$$

onde  $x$  é o valor real apresentado por cada dado amostral. A falta de conhecimento sobre a distribuição de probabilidade das variáveis é a característica que leva a se adotar o procedimento proposto por Yamamura, que sugere como parâmetro constante o valor 0,5. No caso deste trabalho em particular, a ocorrência de muitos valores iguais a zero nas medidas de HSP72 e HSP73 por ELISA (na verdade, valores abaixo dos níveis detectáveis pela técnica) levou-nos a tal opção.

# HIPÓTESES, PREDIÇÕES E RESULTADOS

---

Seguindo a linha de raciocínio desenvolvida no capítulo de Introdução passamos a investigar se a eHSP70 liga-se à insulina circulante e qual seria o papel fisiológico de tal ligação.

## **HIPÓTESE 1: HSP70 funciona como *chaperona* extracelular ligando-se à insulina**

**PREDIÇÃO 1A: A HSP70 extracelular deve ligar-se à insulina com alta afinidade em simulações matemáticas.**

Se a ligação entre a HSP70 e a insulina ocorre na circulação sanguínea, esta deve ser demonstrada em modelo *in silico* de modelagem matemática, que deve mostrar ancoragem e ligação da insulina ao sítio de ligação de peptídeo da HSP70.

### **RESULTADOS RELATIVOS À PREDIÇÃO 1A:**

Os resultados dos ensaios *in silico* indicam ancoragem de alta afinidade e interação estável entre a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) e a insulina. Apresentamos na Figura 5 imagem de um refinamento da solução de ancoragem entre o domínio de ligação ao substrato (SBD) da HSP70 e a insulina através da dinâmica molecular (MD). As corridas de MD entre o SBD da HSP70 e a insulina mostraram, através da análise de resíduos pelo método do desvio quadrático médio (*Root-mean-square deviation*, RMSD) da posição de cada átomo, que o sistema mostrou-se estável por até 20 ns após o início da simulação (Figura 6a). A distância entre o centro de massa

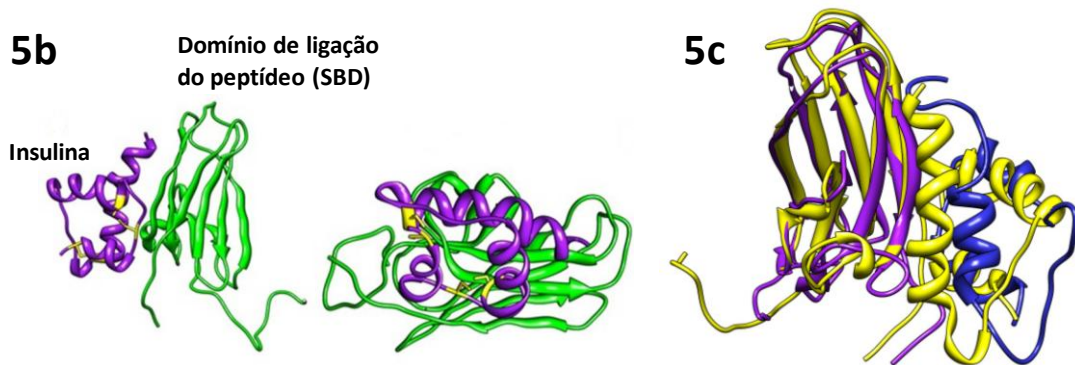
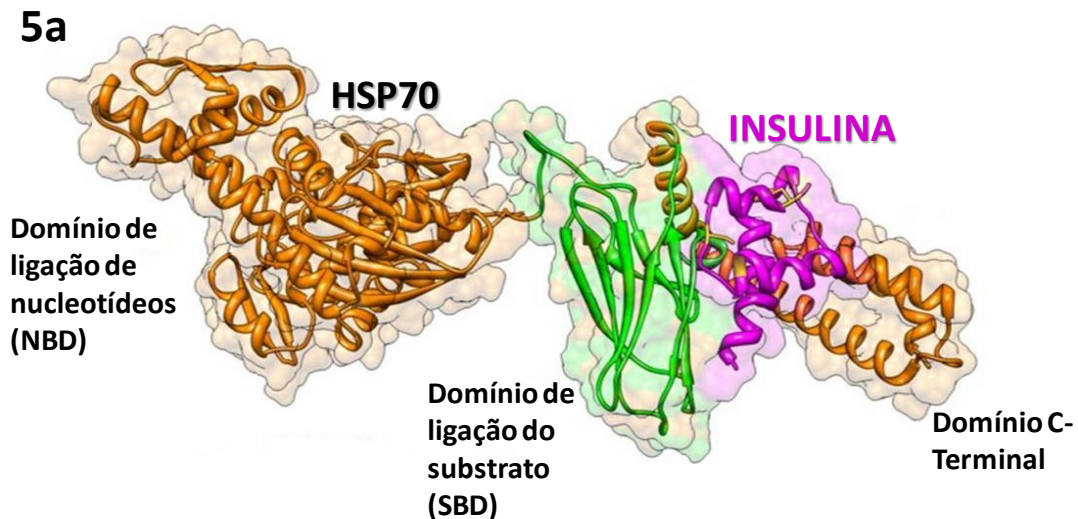


dos dois componentes proteicos do sistema de ancoragem (HSP70 e insulina) é constante ao longo de todo o período de simulação (Figura 6b), como pode ser observado através da sobreposição dos quadros inicial e final durante a trajetória das corridas de MD (Figura 5c), e pelo fato de o raio de giro do sistema sugerir que se trata de um processo de compactação típico da interação entre dois peptídeos em solução (Figura 6c).

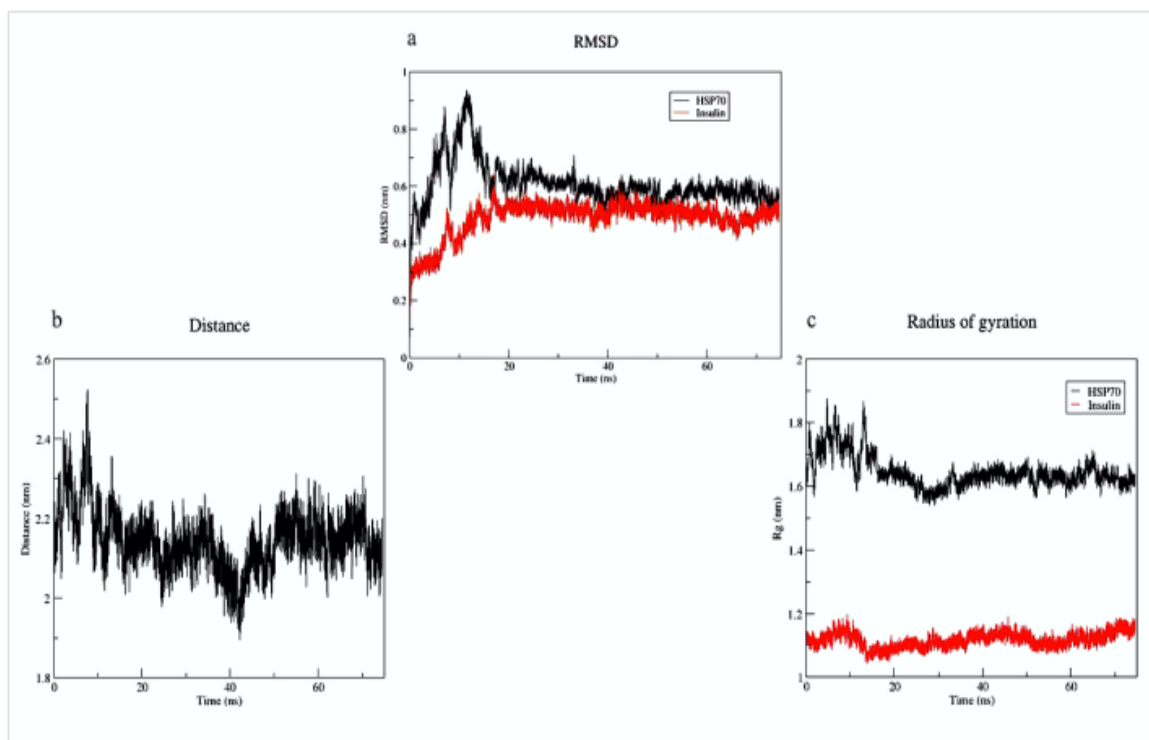
A análise da interface de interação a partir do primeiro quadro da corrida de MD da solução de ancoragem (interação proteína-proteína) com o PDBsum mostrou que a superfície de contato do SBD da HSP70 é de 1036 Å com 23 resíduos de interação, e a da insulina é 1091 Å com 19 resíduos de interação. As interações entre estes resíduos são compostas principalmente por contatos não covalentes (102 ao todo) com algumas ligações de hidrogênio (8 no total) (Figura 7c). A interface de interação observada a partir do último quadro da dinâmica molecular da solução de ancoragem com PDBsum (também interação proteína-proteína) mostrou que a superfície de contato para SBD de HSP70 é 870 Å com 20 resíduos de interação, enquanto que a da insulina é 989 Å, com 13 resíduos interagindo. Neste caso, também, as interações entre os referidos resíduos são compostas principalmente por contatos não covalentes (96 ao todo) com algumas ligações de hidrogênio (total, 12)(Figura 7d).

Estes resultados indicam que a interação entre o domínio de ligação de substrato (SBD) da HSP70 é estável.

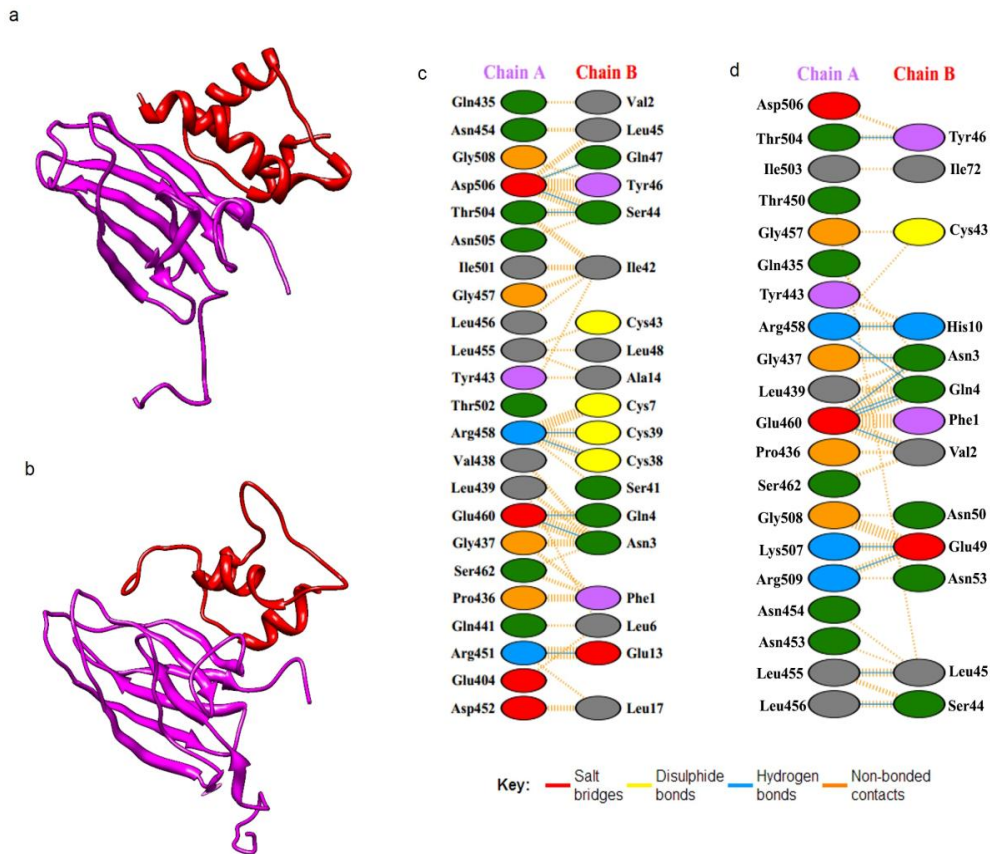
O sistema acoplado foi muito estável durante o curso de 60 ns da simulação, e mostrou uma quantidade significativa de resíduos de interação na interface de proteína-proteína. O detalhamento da técnica empregada está descrito no capítulo de Materiais e Métodos e em GRUNWALD (2013).



**Figura 5. Modelagem molecular da interação entre HSPA1A e insulina.** **5a)** Modelo molecular da interação entre a HSP70 e a insulina, gerado com MODELLER v9.8. Foi selecionado o melhor modelo entre cinquenta com base nos parâmetros fornecidos pelo servidor PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>). O modelo compreende o domínio de ligação de nucleotídeos (NBD), o domínio de ligação do substrato (SBD) e o domínio C-terminal. **5b)** Diferentes pontos de vista dos experimentos de acoplamento entre o domínio de ligação do peptídeo (da HSP70) e insulina por ClusPro 2.0 (<http://http://cluspro.bu.edu/>). Para a insulina, foi utilizada a entrada 1ZEI\_F no Banco de dados de Proteínas (PDB), o dissulfeto formando cisteínas da insulina (CYS19 e CYS52, CYS43 e CYS38) são destacadas em amarelo. A insulina está mostrada em rosa, e o domínio de ligação do peptídeo da HSP70 está colorido em verde. **5c)** Superimposição dos quadros inicial e final da corrida de dinâmica molecular entre a HSP70 e a insulina. Ambas as estruturas iniciais estão em amarelo. No quadro final, o sítio de ligação de peptídeos (PBD) da HSP70 está em magenta e a insulina em azul. Todas as imagens foram obtidas com o software CHIMERA UCSF.



**Figura 6. Simulação de dinâmica molecular para o acoplamento entre a HSPA1A e a insulina.** Parâmetros estruturais tempo-dependentes das simulações da dinâmica molecular (MD). **a)** Análise de resíduos pelos desvios quadráticos médios (RMSD) da posição de cada átomo na solução de acoplamento entre o domínio de ligação do peptídeo (PBD) da HSP70 e insulina. **b)** Raio de giro dos componentes do sistema em separado. **c)** Distância entre o centro de massa dos dois componentes do sistema.



**Figura 7. Diagramas de interação proteína-proteína entre HSPA1A e insulina.** Extratos dos diagramas de interação proteína-proteína em *PDBsum* para PDB resultantes dos quadros inicial e final das dinâmicas moleculares da solução de acoplamento entre o domínio de ligação do substrato (SBD) da HSP70 e insulina. (a) Imagem em miniatura do modelo estrutural em 3D do quadro inicial da solução de ancoragem; o SBD da HSP70 está em magenta (cadeia A) e a insulina, em vermelho (cadeia B). (b) Imagem em miniatura do modelo estrutural em 3D do quadro final da solução de ancoragem; SBD da HSP70 é dado em magenta (cadeia A) e insulina, em vermelho (cadeia B). (c) Detalhe das interações individuais resíduo-resíduo através desta interface do quadro inicial da dinâmica molecular da solução de ancoragem. (d) Detalhe das interações individuais resíduo-resíduo através desta interface do quadro final da dinâmica molecular da solução de ancoragem.

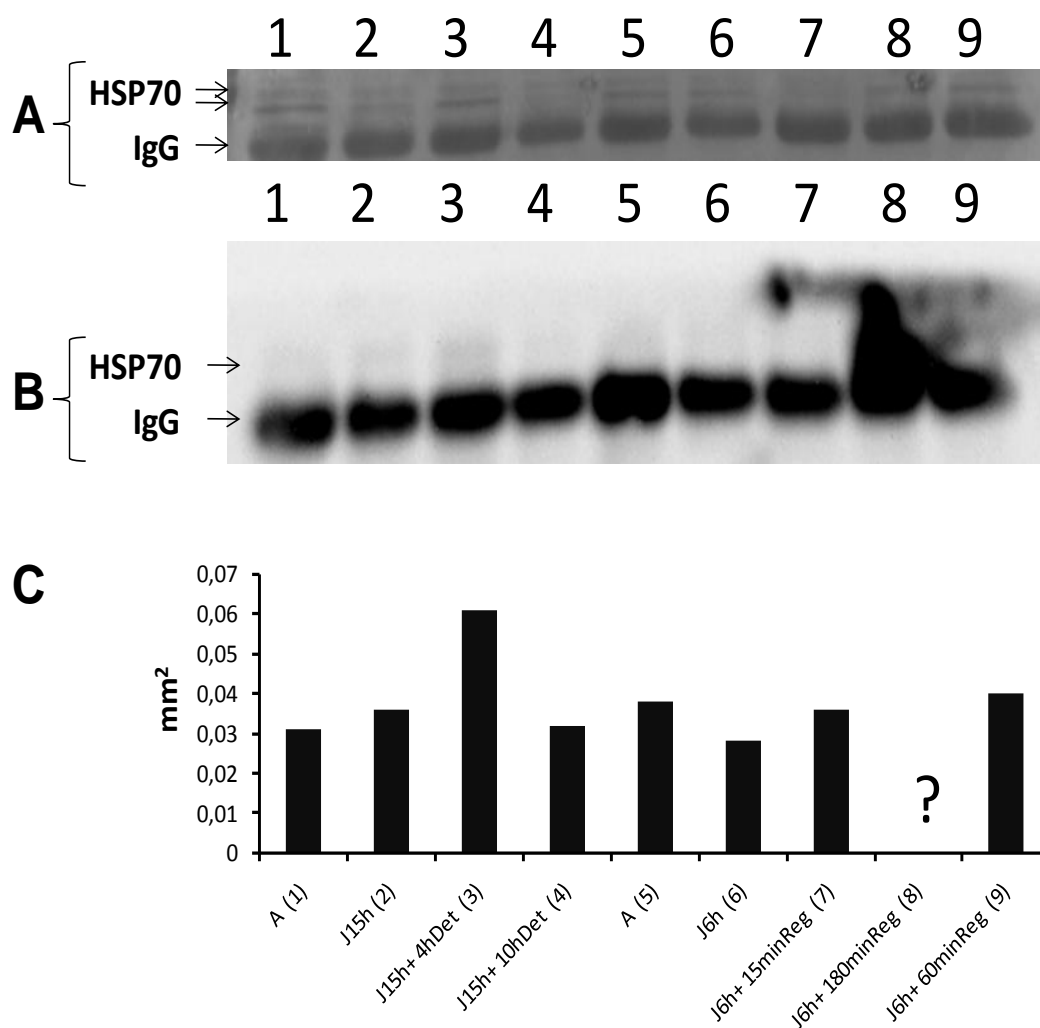
**PREDIÇÃO 1B: Se os resultados *in silico* são verdadeiros, HSP70 extracelular deve ligar-se *in vivo* à insulina e coimunoprecipitar com a mesma no plasma**

Se a abordagem teórica apresentada na Predição 1A for considerada como de ocorrência real, a ligação entre a HSP70 e a insulina deve ocorrer também em soluções reais. Conseqüentemente, uma reação de imunoprecipitação de plasma com anticorpo anti-insulina deve revelar a presença de HSP70 coimunoprecipitada, e vice-versa, mostrando que as duas encontravam-se ligadas no plasma.

**RESULTADOS RELATIVOS À PREDIÇÃO 1B:**

Para demonstrar a ocorrência de ligação entre HSP70 e a insulina plasmáticas, foram realizadas abordagens de imunoprecipitação, que confirmam os resultados dos experimentos de simulação matemática de que ocorre ligação entre a eHSP70 e a insulina circulantes.

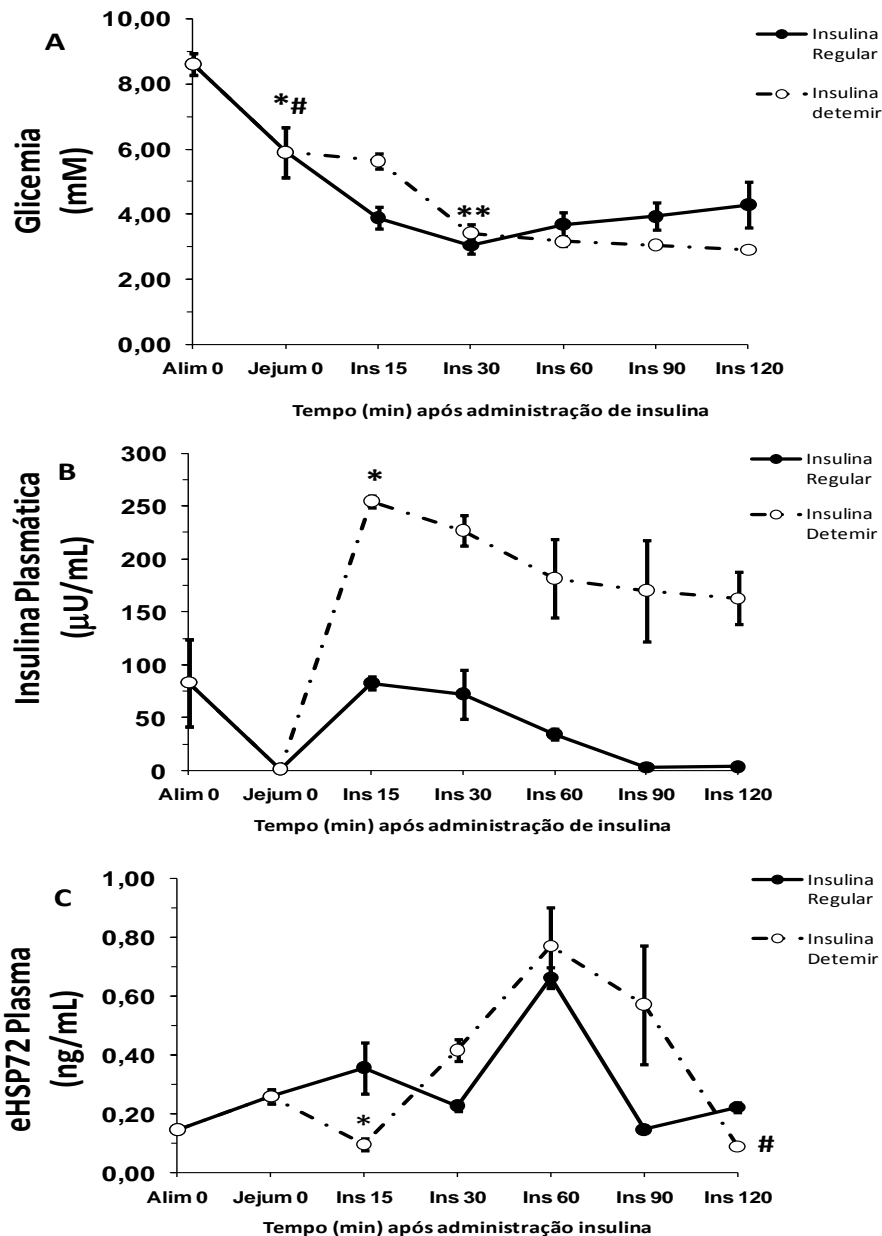
Para verificarmos se o efeito do desafio hipoglicemiante induzido por insulina e/ou jejum poderia estar relacionado com a liberação de HSP70 na circulação e sua ligação da insulina à HSP70 circulante, amostras de plasmas de animais alimentados, em jejum (de 6 ou de 15 horas), com e sem tratamento com insulina (insulina de ação rápida- Regular e insulina de ação lenta- Detemir) foram imunoprecipitados contra a insulina, com anticorpo específico. Após a reação imunológica, as amostras foram lavadas e submetidas à eletroforese nativa e imunodeteção de HSP70 com anticorpos específicos (*cf.* Material e Métodos). O resultado revelou coimunoprecipitação de HSP70 em, pelo menos, duas bandas de alto peso molecular (> 150 kDa, peso molecular da IgG I), conforme ilustrado na figura 8.



**Figura 8. Coimunoprecipitação de HSP70 utilizando-se anticorpo anti-insulina em amostras de plasmas.** Membrana representativa de experimento realizado com amostras de plasmas de ratos alimentados, em jejum com e sem tratamento com insulina, após imunoprecipitação com anticorpo anti-insulina. Após a reação imunológica e eletroforese nativa, as amostras foram reveladas com anticorpo monoclonal anti-HSP70 (clone BRM22 que reconhece as formas HSP72 e HSP73). **(A)** Membrana corada com Vermelho de Ponceau S. **(B)** Proteínas reveladas por quimiluminescência. **(C)** Representação gráfica ILUSTRATIVA da imagem, quantificada em mm<sup>2</sup> (o ponto de interrogação no grupo 8 indica impossibilidade de quantificação). Grupos: **1**= alimentado; **2**= jejum de 15 horas; **3**= jejum 15 horas, sacrificado 4 horas após administração de insulina Detemir; **4**= jejum de 15 horas, sacrificado 10 horas após administração de insulina Detemir; **5**= alimentado; **6**= jejum de 6 horas; **7**= jejum de 6 horas, sacrificado 15 minutos após a administração de insulina regular; **8**= jejum de 6 horas, sacrificado 60 minutos após administração de insulina regular e **9**= jejum de 6 horas sacrificado 180 minutos após a administração de insulina regular.

Parte das amostras de plasma dos animais submetidos a jejum com/sem insulina foi submetida à quantificação em kit específico para a forma induzível da HSP70 (HSP72), insulina e glicose, cujos resultados são mostrados na Figura 9. Observa-se declínio acentuado da glicemia de jejum a partir de 15 minutos após a administração de 'regular', ou seja, uma ação rápida e intensa da glicemia, que se acentua aos 30 minutos e, em seguida, se mantém estável.

No grupo de animais tratados com a insulina Detemir, o efeito hipoglicemiante é observado a partir de 30 minutos ( $3,43 \pm 0,27 \text{mM}$ ) depois da injeção da insulina mantendo-se baixo durante o tempo de análise, ou seja, até 120 minutos. Neste mesmo grupo, observa-se aumento da concentração de HSP70 na circulação a partir do momento em ocorre o declínio da glicemia com um pico ( $0,77 \pm 0,13 \text{ ng/ml}$ ) no momento em que a glicemia atinge valor crítico ( $3,17 \pm 0,15 \text{ mM}$ ).

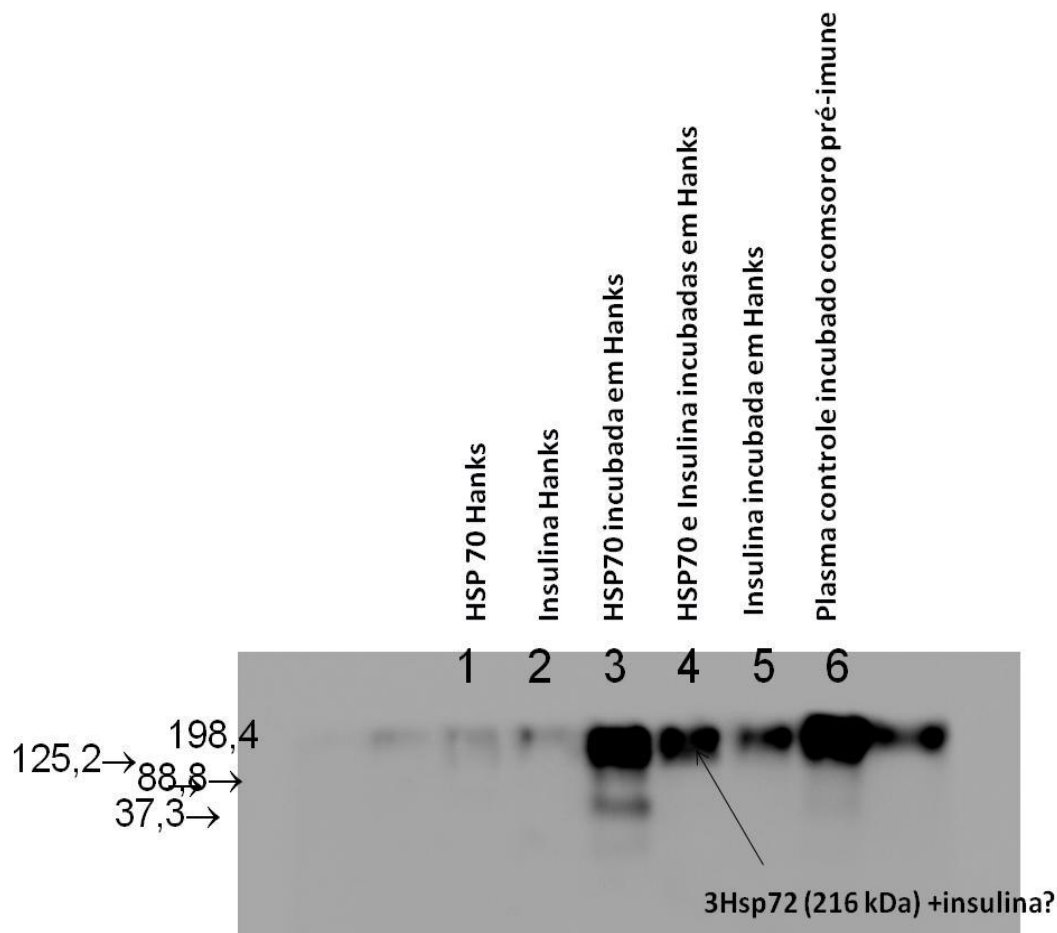


**Figura 9. Concentração plasmática de glicose, insulina e HSP72 em amostras de plasma.** Concentrações plasmáticas de **(A)** glicose, **(B)** insulina e **(C)** HSP72 nas amostras de plasma obtidas de animais mantidos em jejum de 15 horas (grupo Insulina Detemir) e 06 horas (grupo Insulina Regular) e submetidos à administração de 1U/kg de Insulina (Regular- de ação rápida e Detemir- ação lenta). As amostras de plasma foram coletadas de 15 em 15 minutos para determinação de glicose, insulina e HSP72 por kits específicos. Alim= animais alimentados; Jejum= animais em Jejum no tempo zero (0). Dados expressos média±epm; n=3, com duplicata. Análise de variância seguido pelo Teste de Tukey. **A) Glicemia:**\* Jejum vs Alimentado 0 min; # Jejum vs Ins Reg 15, 30, 60, 90 e 120 min e Alimentado 0 min; \*\* Ins Det 30 min vs Jejum 0 min e Alimentado 0 min para  $p < 0,05$ . **B) Insulina:** \* Det15 min vs Jejum e ao Alimentado 0 min; **C) HSP72:** \* Det 15 min vs Det 60 min e 90 min; # Det 120 min vs Det 60 min e Det 90 min para  $p < 0,05$ .



Foi preparado outro protocolo experimental para conferir novamente a coimunoprecipitação das duas proteínas (insulina e HSP70). Em um primeiro conjunto de experimentos, padrões nativos de HSP72 e insulina, isolados ou em combinações, foram incubados por 90 min a 37 °C sob agitação e, posteriormente, imunoprecipitados contra a insulina após clarificação com soro pré-imunizado de camundongo.

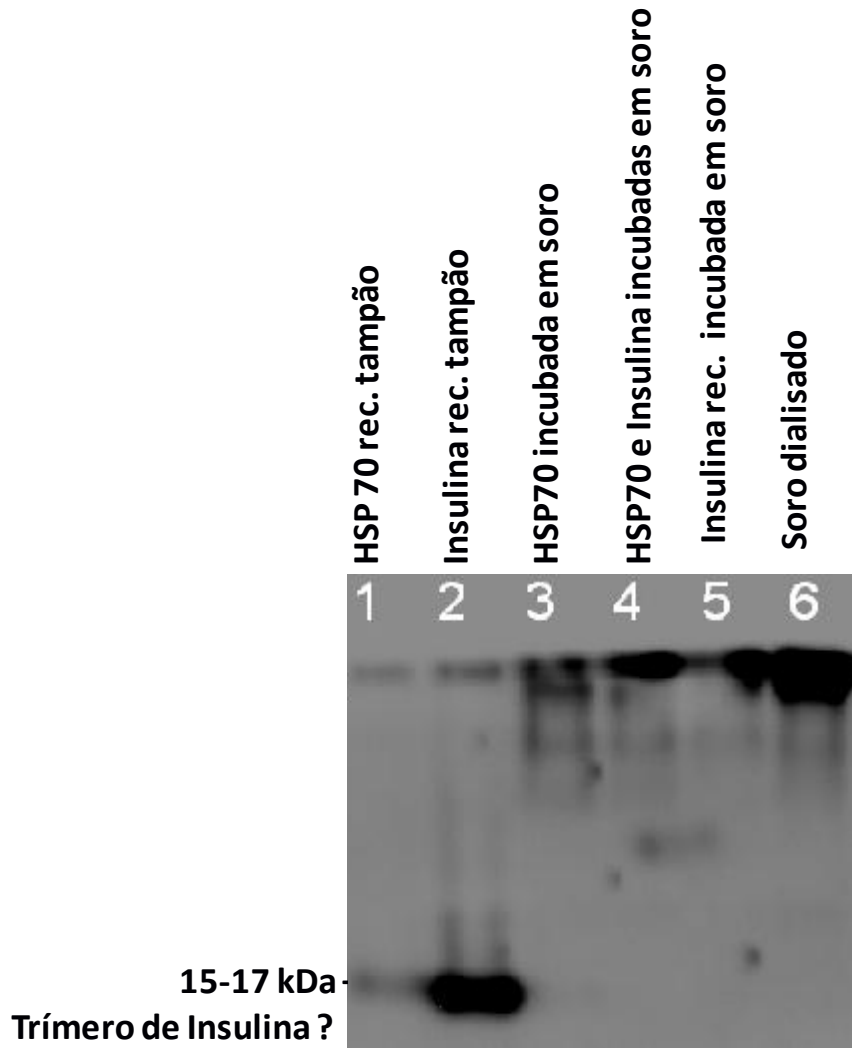
Conforme mostrado na Figura 10, a simples incubação da HSP70 no soro dialisado (banda 3 da Figura 10) leva à sua coimunoprecipitação com a insulina revelando duas bandas principais quando reveladas contra HSP70 nas membranas de nitrocelulose (uma de cerca de 150 kDa correspondente à IgG utilizada nos ensaios, e outra correspondente ao peso molecular da própria HSP72). Quando ambas as proteínas são incubadas juntas (banda 4 da Figura 10), a banda correspondente à HSP70 isolada desaparece e só é encontrada uma resposta de imunodeteção contra HSP70 na mesma banda de cerca de 150-200 kDa. Quando incubada sozinha em soro dialisado (cutoff de 16 kDa), a insulina imunoprecipitada também revela imunodeteção de HSP70, sugerindo que a insulina reagiu com alguma HSP70 previamente presente no plasma utilizado, o que é confirmado pela imunoprecipitação da insulina em soro controle (banda 6 da Figura 10) em que se observa a coimunodeteção de HSP70.



**Figura 10. Coimunoprecipitação de HSP70 utilizando-se anticorpo anti-insulina e insulina.** Grupos **1**= HSP70 recombinante preparada diretamente em tampão de amostra e submetida a eletroforese; **2**= Insulina recombinante preparada diretamente em tampão de amostra e submetida a eletroforese; **3**= somente HSP70 incubada em Hanks imunoprecipitada contra insulina; **4**= HSP70 recombinante e Insulina incubadas em Hanks; **5**= Insulina recombinante incubada em Hanks; **6**= plasma controle (animal alimentado) incubado com soro pré-imune de camundongo. Após as imunoprecipitações, as amostras, submetidas à eletroforese nativa e eletrotransferência, foram reveladas com anticorpo anti-HSP70.

Num segundo conjunto de experimentos, os mesmos padrões nativos de HSP72 e insulina, isolados ou em combinações, foram incubados por 90 minutos a 37 °C sob agitação, e, posteriormente, imunoprecipitados contra a HSP70 após clarificação com soro pré-imune de camundongo.

Conforme mostrado na (Figura 11), as amostras incubadas com anticorpo anti-HSP70 revelam insulina na altura do peso molecular entre 15-17 kDa, sugerindo a formação de um trímero de insulina (PM ~5,5 kDa).



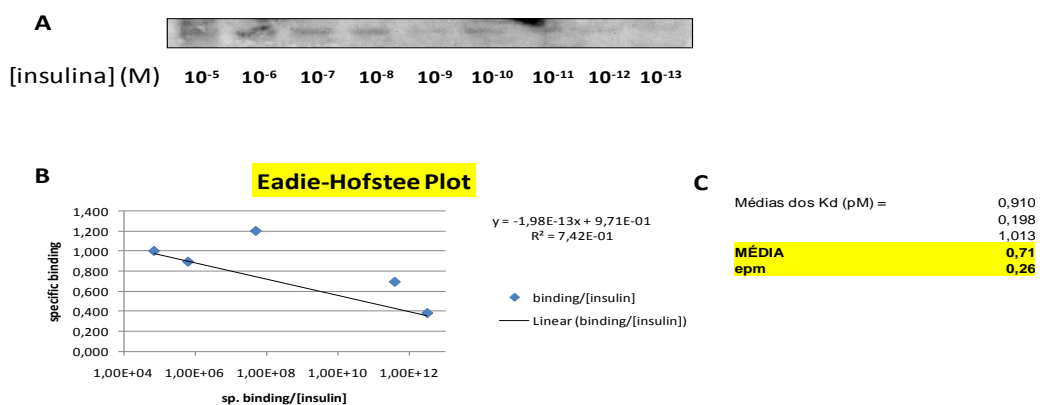
**Figura 11. Coimunoprecipitação de insulina utilizando-se anticorpo anti-HSP70.** Grupos **1**= HSP70 recombinante preparada diretamente em tampão de amostra e submetida a eletroforese; **2**= Insulina recombinante preparada diretamente em tampão de amostra e submetida a eletroforese; **3**= somente HSP70 incubada em Hanks imunoprecipitada contra insulina; **4**= HSP70 recombinante e Insulina incubadas em Hanks; **5**= Insulina recombinante incubada em Hanks; **6**= plasma controle (animal alimentado) incubado com soro pré-imune de camundongo.. Após as imunoprecipitações, as amostras, submetidas à eletroforese nativa e eletrotransferência, foram reveladas com anticorpo anti-insulina.

Para confirmarmos, uma vez mais, a identidade da coimunoprecipitação e testarmos sua especificidade, foram preparados experimentos em que HSP70 recombinante foi incubada na presença de insulina biotinilada (identificada eletroforeticamente depois dos ensaios), tendo em vista que os anticorpos anti-IgG marcados com peroxidase poderiam estar apresentando reações cruzadas com os anticorpos usados nas imunoprecipitações (IgG de camundongo para precipitar HSP70 e IgG de cobaio para precipitar a insulina). Nos experimentos anteriores, quando a insulina foi precipitada com IgG de cobaio, foi utilizada IgG de coelho anti-IgG de camundongo (usado na detecção de HSP70) e, quando HSP70 foi imunoprecipitada com IgG de camundongo, foi utilizada IgG de cabra anti-IgG de coelho (usado na detecção de insulina). Embora os anticorpos secundários marcados com peroxidase sejam muito específicos para reconhecer apenas as IgGs apresentando reação imunológica, sempre resta a dúvida de que as IgGs secundárias possam estar reagindo com partes das IgGs utilizadas nas imunoprecipitações, e que não tenham se dissociado durante a eletroforese nativa.

Por estas razões, foram preparados experimentos similares, substituindo-se a técnica de revelação das proteínas pós-eletroforese pela simples reação com estreptavidina conjugada com peroxidase (estreptavidina-HRP), que se liga fortemente a proteínas biotiniladas. Assim, foram incubadas quantidades crescentes de insulina fria, (0; 0,69; 1,38; 2,76; 5,50; 11,04 e 69  $\mu$ M, correspondentes a 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 50  $\mu$ g por ensaio, conforme descrito em Materiais e Métodos) na presença de concentração fixa de insulina biotinilada (1,38  $\mu$ M) e idêntica quantidade de HSP72 (1,38  $\mu$ M). Após as incubações, as amostras foram imunoprecipitadas com anticorpo anti-HSP70 (clone BRM22, feito em camundongo, que reconhece ambas as principais formas da HSP70, HSP72 e HSP73), submetidas à eletroforese não redutora e pouco estridente para preservar as ligações intermoleculares e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. As proteínas biotiniladas foram reveladas com estreptavidina-HRP com o auxílio de reagente ECL Prime (GE).

Os experimentos de competição (Figura 12) revelaram marcação decrescente nas bandas onde maiores quantidades de insulina fria foram coincubadas com uma constante de dissociação de valor na faixa de 1 pM.

Os pesos moleculares dos coimunoprecipitados de insulina biotinizada e HSP70 foram calculados conforme mostrado na Figura 2, no capítulo Materiais e Métodos.



**Figura 12. Coimunoprecipitação competitiva de insulina biotinizada com HSP70 e cálculos relativos à constante de dissociação (Kd) da ligação entre insulina e HSP70.** Incubação de HSP72 (fixa, 1,38 uM) com concentrações decrescentes de insulina biotinizada seguida de imunoprecipitação da HSP72 e revelação com estreptavidina. **(A)** Gel representativo da coimunoprecipitação competitiva de insulina biotinizada com HSP70; **(B)** Gráfico representativo dos cálculos realizados com diagrama de Eadie-Hofstee ( $binding \times binding/[insulina]$ ); Kd é o coeficiente angular da reta e **(C)** Médias do Kd (pM).

Somados, os resultados das imunoprecipitações confirmam os experimentos *in silico* sugerindo que existe interação proteína-proteína entre a HSP70 e a insulina, e que esta interação parece ser do tipo chaperona-proteína cliente, uma vez que a insulina liga-se ao domínio de ligação a proteínas, pelo menos na abordagem teórica apresentada acima.

**HIPÓTESE 2: A ligação de HSP70 com a insulina indisponibiliza o hormônio para ligação a seus receptores *in vivo* provocando aumento na oferta de glicose para o plasma**

Tendo em vista que a HSP70 liga-se à insulina, vem a pergunta: Por que se liga? Qual o papel fisiológico? Supõe-se que deva existir um papel fisiológico relevante para a ligação entre esta proteína de choque térmico e um importante hormônio de regulação glicêmica, a insulina, considerando que durante o processo evolutivo a HSP70 foi minuciosamente selecionada para papéis de defesa-chave em várias situações de estresse. Uma possibilidade é de que esta ligação seja uma estratégia de provocar a diminuição da utilização periférica de glicose e a manutenção da condição de normoglicemia durante momentos de estresse, até que as moléculas circulantes de insulina tenham sido descartadas da circulação. Neste sentido, há que se considerar o tempo de permanência da insulina na circulação, já que cada molécula de insulina persiste por mais de uma hora na circulação depois de ter sido secretada. Este período seria tempo suficiente para o desenvolvimento de severa hipoglicemia caso o hormônio persistisse agindo nestas situações de estresse.

**PREDIÇÃO 2A: O choque térmico deve elevar a concentração de eHSP70 circulante e assim, promover alteração na resposta glicêmica.**

O choque térmico, como fator de estresse, estimula a expressão e secreção de HSP70 para o meio extracelular e, assim, tem potencial para aumentar sensivelmente as concentrações plasmáticas de HSP70. Destarte, após o choque térmico devemos ter eHSP70 na circulação, e esta deve se ligar à insulina causando diminuição da ação insulínica, o que poderá ser observado na resposta do organismo ao teste de tolerância à glicose.

Para comprovarmos o efeito do choque térmico sobre o nível glicêmico, foram realizados testes de tolerância à glicose (GTT, 1 g de glicose/kg de peso, via i.p) em diferentes tempos (06, 12 e 24 horas) após os animais terem sido submetidos ao choque térmico. Os valores de glicemia foram mensurados ao longo de 120 minutos após a administração de glicose.

### **RESULTADOS RELATIVOS À PREDIÇÃO 2A:**

O choque térmico causa maior elevação da concentração de glicose circulante durante o teste de tolerância à glicose, confirmando a Predição 2A, no tempo experimental 12 horas pós-choque térmico. Neste tempo experimental, o grupo submetido ao choque térmico apresentou elevação da glicemia de cerca de 120% em relação à glicemia de jejum, representando um acréscimo na concentração circulante de glicose de aproximadamente 80mg/dL após (30minutos) a injeção de glicose. Já no grupo controle, o aumento da glicemia foi de cerca de 50 mg/dL, correspondendo a um aumento de cerca de 70% em relação à glicemia de jejum (Figura 13B).

O resultado do teste de tolerância à glicose com animais sem restrição alimentar é semelhante, apesar de uma diferença na elevação ainda maior na glicemia no grupo choque térmico. No grupo choque térmico, observamos um pico glicêmico de cerca de 150 mg/dL ,enquanto que, no grupo controle, a glicemia chegou em cerca de 100 mg/dL 30 minutos após a injeção de glicose, o que significa que no grupo choque térmico a elevação da glicemia foi cerca de 40% maior do que no grupo controle (Figura 13 D).

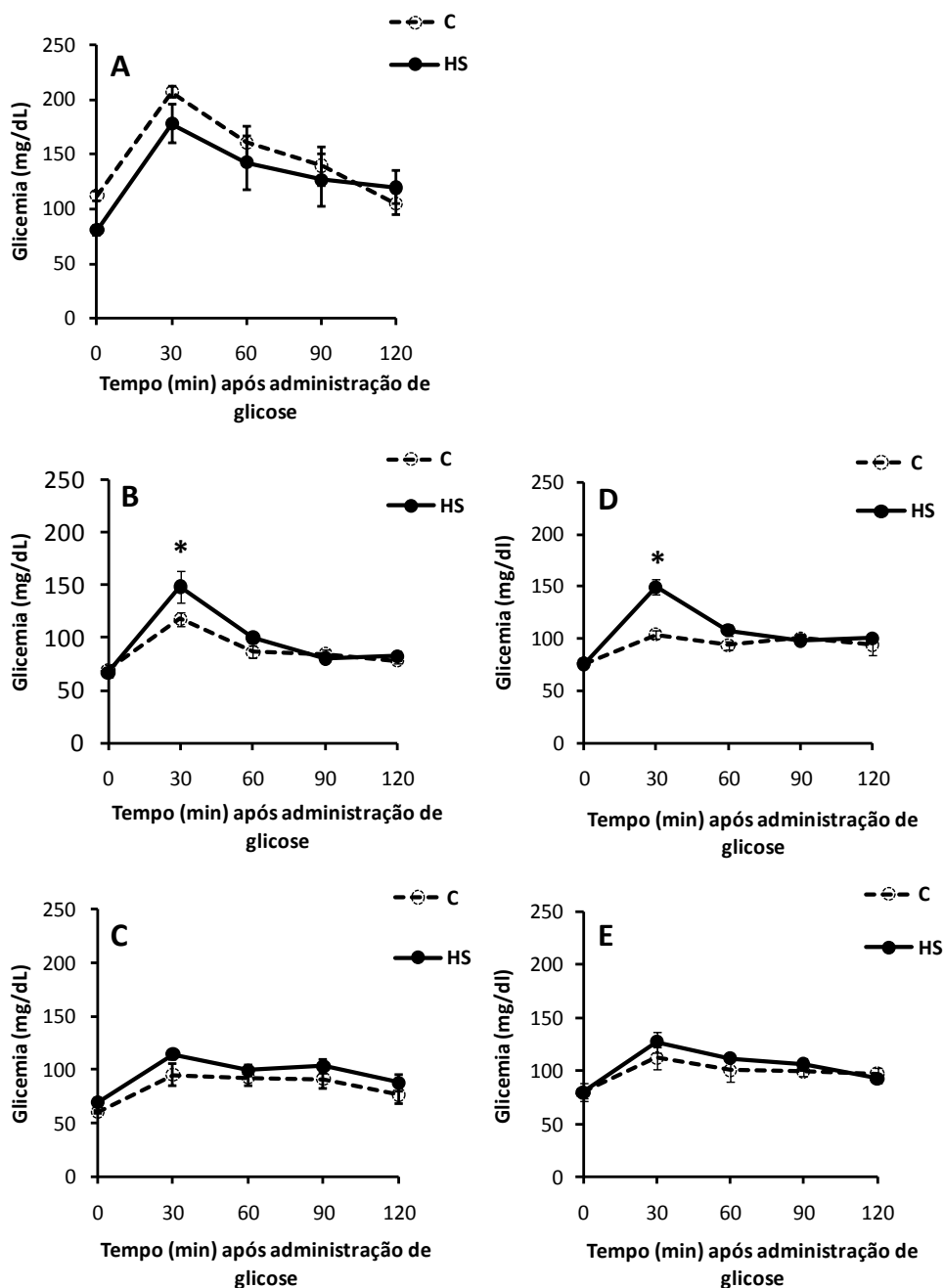
A diferença, portanto, na disponibilidade de glicose circulante entre os animais do grupo choque térmico e o respectivo controle 30 minutos após a injeção, indica que o choque térmico modifica a resposta glicêmica durante o teste de tolerância à glicose, quando este é realizado no período pós-choque térmico de 12 horas (Figura 13B e 13D).

O efeito do choque térmico sobre a resposta glicêmica não foi diferente entre os grupos experimentais (C e HS) quando o teste de tolerância à glicose foi realizado nos tempos de 06 (Figura 13A) e 24 horas (Figura 13C e 13E) após o choque térmico (Figura 13A e 13C). Contudo, a variação da glicemia entre o tempo zero e 120 minutos da curva

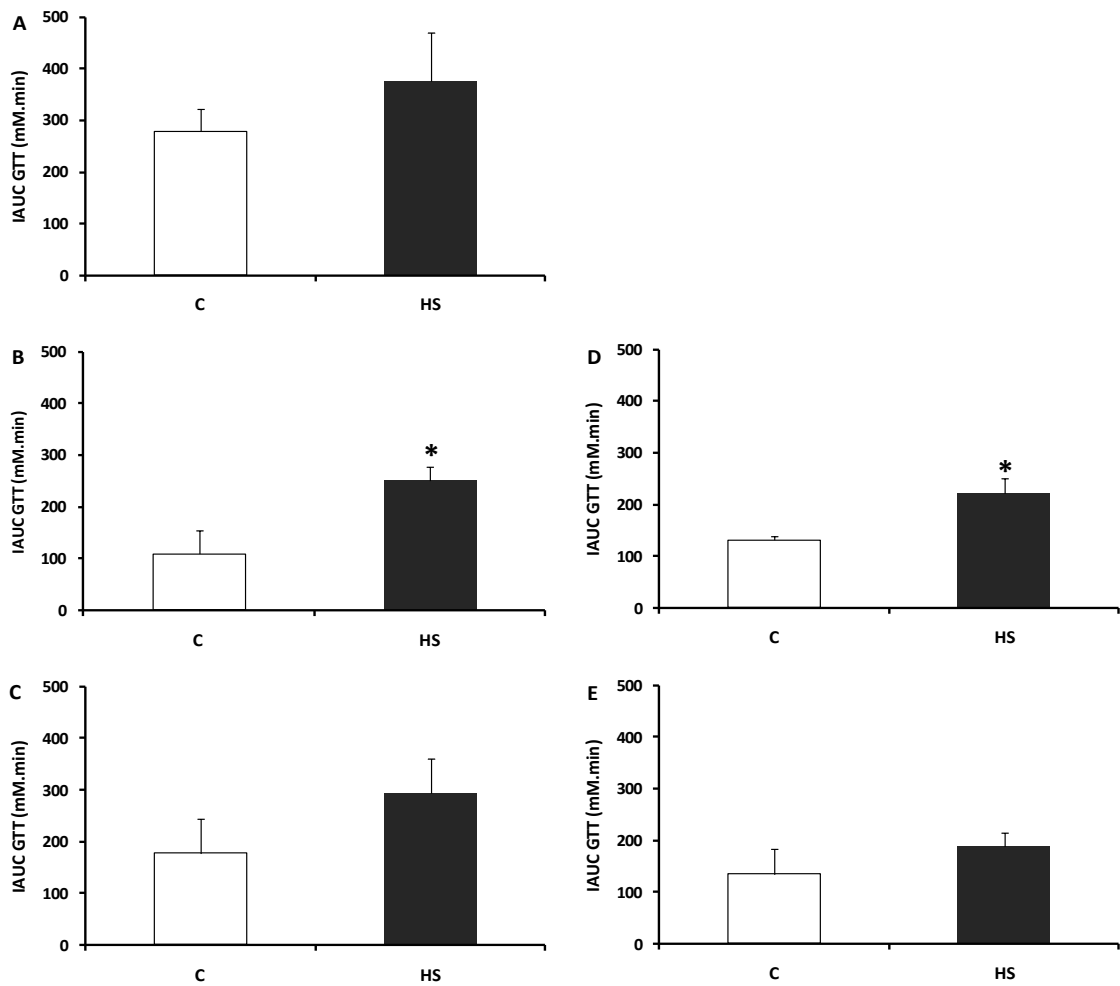


glicêmica, no grupo choque térmico, no tempo experimental 06 horas pós-choque (Figura 13A), parece anunciar uma condição de menor tolerância à glicose, visto que a capacidade de recuperação da glicemia 120 minutos após a administração de glicose é diferente entre os animais submetidos ao choque térmico e os respectivos controles. A curva glicêmica dos animais do grupo HS, 06 horas depois do choque térmico, indica uma concentração circulante de glicose 48% superior à respectiva glicemia de jejum, enquanto que, no grupo controle, o declínio da curva indica uma completa recuperação da glicemia de jejum (Figura 13A).

Os valores da glicemia de jejum de ambos os grupos não são diferentes em nenhum dos tempos pós-choque avaliados. Os animais de ambos os grupos apresentam-se normoglicêmicos em jejum, exceto imediatamente após o choque térmico (efeito do anestésico). Após a obtenção dos dados relativos aos testes de tolerância à glicose, procedeu-se o cálculo da área incremental sob a curva, calculada geometricamente por meio da aplicação da regra trapezoidal, excluindo-se as áreas abaixo da linha de jejum. Os valores obtidos (Figura 14) confirmam que a resposta à sobrecarga de glicose é diferente nos animais submetidos ao choque térmico em comparação ao grupo controle. A área incremental sob a curva dos animais submetidos ao choque térmico é maior do que a do grupo controle quando o teste de tolerância é realizado 12 horas após o choque térmico, tanto para os animais mantidos em jejum como para os animais sem restrição alimentar (antes do teste). Do mesmo modo conforme observado nas curvas glicêmicas, as IAUCs dos grupos C e HS não são diferentes quando o teste de tolerância à glicose é realizado 06 e 24 horas após o choque térmico.



**Figura 13. Testes de tolerância à glicose realizados nos tempos experimentais de 06, 12 e 24 horas pós-choque térmico.** Teste de tolerância à glicose i.p. (IPGTT, 1 g/kg) realizado nos tempos de **(A)** 06 horas; **(B)** 12 horas com animais em jejum (de 12 h); **(C)** 24 horas com animais em jejum (de 12 h); **(D)** 12 horas com animais alimentados; e **(E)** 24 horas com animais alimentados, após choque térmico (41-42°C, por 15 minutos). Glicemia mensurada com glicosímetro (*Optium Xceed da Abbott*) por punção caudal distal. Grupos experimentais Controle (C) e Choque térmico (HS). Dados expressos em média  $\pm$  epm,  $n=4$  (**A**, **C** e **E**),  $n=6$  (**B** e **D**). Análise de variância de medidas repetidas para comparação dos animais do mesmo grupo ao longo do tempo e Análise de variância de uma via seguido do Teste de Tukey para comparação entre os grupos: **(B e D)\*HS 30 min vs. C 30 min**,  $p < 0,05$ .



**Figura 14. Área incremental sob a curva dos testes de tolerância à glicose.** IAUC relativa aos testes de tolerância à glicose realizados nos tempos experimentais de **(A)** 06 horas; **(B)** 12 horas com animais em jejum; **(C)** 24 horas com animais em jejum; **(D)** 12 horas com animais alimentados e **(E)** 24 horas com animais alimentados após choque térmico (41-42°C, por 15 minutos). Glicemia mensurada com glicosímetro (*Optium Xceed da Abbott*) por punção caudal distal. A condição 'jejum' representa restrição alimentar por 12 horas, e a condição 'alimentado' representa ausência de restrição alimentar. Grupos experimentais Controle (C) e Choque térmico (HS). Dados expressos em média  $\pm$  epm, n= 4 **(A, C e E)**, n= 6 **(B e D)**. Teste T para comparação entre o grupo C vs grupo HS: **(B e D)\***HS vs. C, p < 0,05.

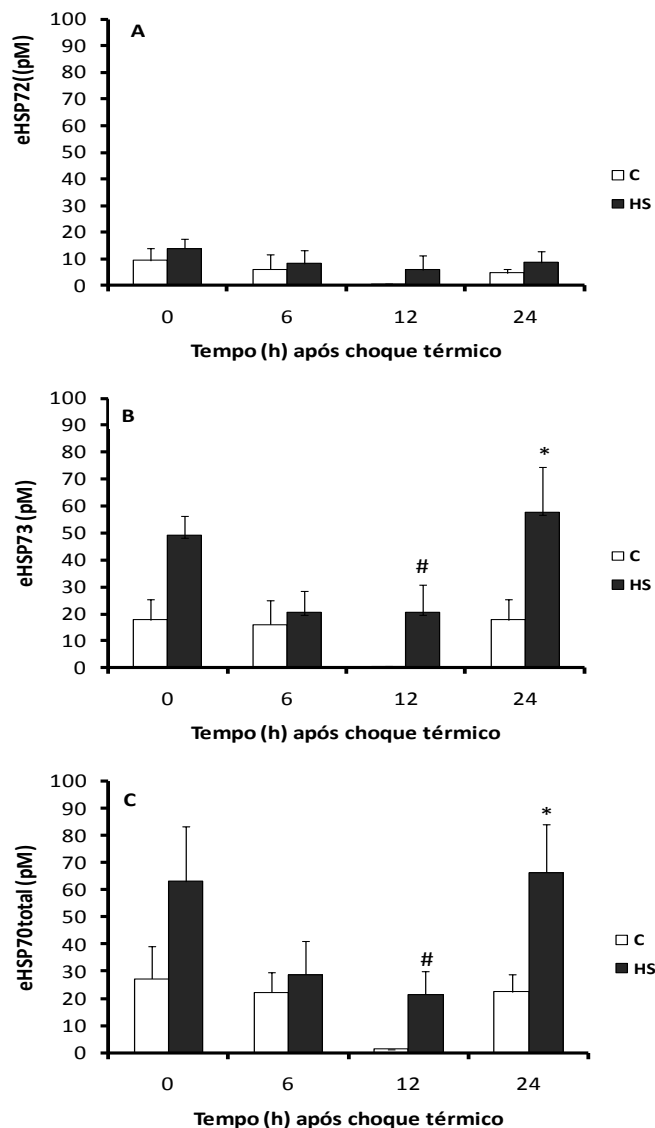
A mensuração da concentração plasmática de HSP70, nas formas constitutiva e induzível, foi realizada com amostras de plasmas de animais em jejum de 12 horas, de ambos os grupos experimentais (C e HS) não submetidos à sobrecarga de glicose e coletadas nos tempos experimentais de: imediatamente após o choque térmico, 06, 12

e 24 horas após o choque térmico. Os resultados foram obtidos por meio de kits específicos (HSP73- Kit *StressMarq Biosciences* e HSP72- Kit *Enzo Life Sciences*). Os valores obtidos foram transformados em dados paramétricos utilizando-se a equação de raiz quadrada do valor mensurado (pM) somado a uma constante 0,5 ( $\sqrt{x+0,5}$ ), em virtude da variabilidade entre os valores obtidos e a ocorrência de valores iguais a zero (com a transformação, estes valores passam a ter valor = 0,71). Estes resultados se encontram ilustrados na Figura 15.

Quanto aos valores de HSP72 e HSP73 12 horas após o choque térmico, isto é, no tempo experimental, os animais apresentaram maior hiperglicemia durante o GTT, podendo-se observar que estes animais (grupo HS) apresentam valor detectável de eHSP70 no plasma, tanto na forma constitutiva (HSP73) quanto na forma induzível (HSP72). No grupo controle, não foi observado valor detectável de HSP72 e HSP73.

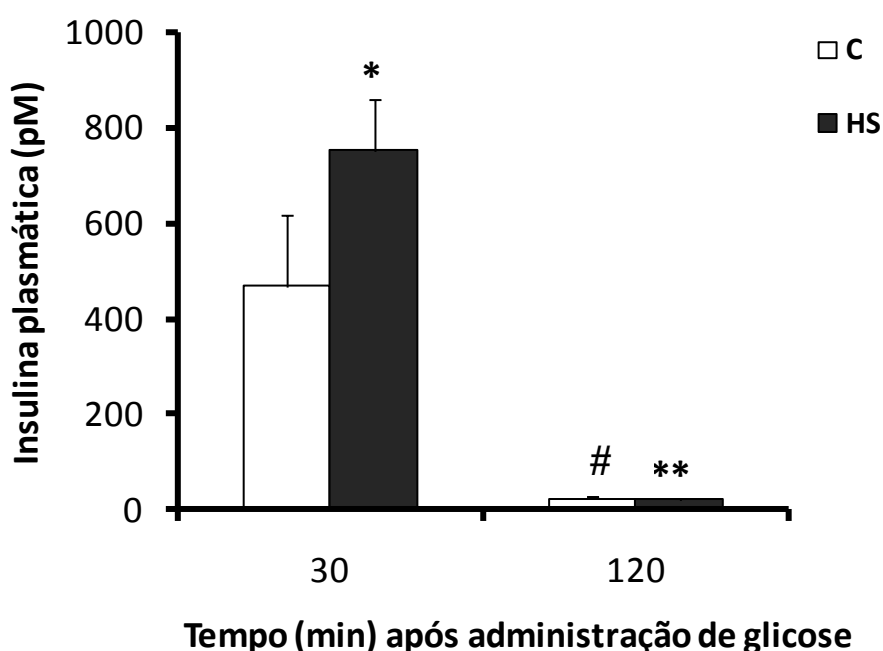
Se compararmos a concentração eHSP73 plasmática entre o grupo controle e grupo choque térmico, observamos diferença estatística somente em relação à eHSP73 plasmática, que, como já mencionado, é detectada somente no grupo HS. Somando-se as formas constitutiva e induzível (HSP 73 + HSP72) circulante (HSP70 total), verifica-se que a concentração de eHSP70 plasmática total é maior ( $p=0,0489$ ) nos animais submetidos ao choque térmico.

A análise do conteúdo de eHSP70 circulante imediatamente após o choque térmico bem como, 6, 12 e 24 horas após o choque térmico, mostra que o grupo de animais submetidos ao choque térmico apresenta valores detectáveis de eHSP70 plasmática, tanto na forma constitutiva (HSP73) quanto na forma induzível (HSP72) (Figura 15) em todos os tempos experimentais. Contudo, não se observa efeito da interação entre o tempo e o tratamento de choque térmico sobre a concentração de HSP72, HSP73 e HSP70 total. Quando analisamos somente o efeito do tratamento em cada tempo experimental individualmente, observamos que 12 e 24 horas após o choque térmico, a concentração de HSP73 e HSP70 total é maior nos animais submetidos ao choque térmico.



**Figura 15. Concentração plasmática de eHSP72, eHSP73 e eHSP70 total, em diferentes tempos experimentais pós-choque térmico.** Concentrações plasmáticas de HSP70. **A)** forma induzível (HSP72), **B)** forma constitutiva (HSP73) e **C)** HSP70total (HSP73+HSP72), mensuradas por Kit de imunoenensaio enzimático (HSP73-Kit StressMarq Biosciences e HSP72-Kit Enzo Life Sciences). Grupos experimentais Controle (C) e Choque térmico (HS). Dados transformados ( $\sqrt{x + 0,5}$ ) (onde x é expresso em pM) e expressos em média $\pm$ epm, n=4. Análise de Variância de duas vias, fator 1: 'tempo experimental', fator 2: tratamento 'C vs HS', seguido de teste de Tukey. **A)** Não há interação entre o tempo e o tratamento (choque térmico) p= 0.993; **B)** Não há interação entre o tempo e o tratamento (choque térmico) p= 0.968. **C)** Não há interação entre o tempo e o tratamento (choque térmico) p= 0.958. Teste T para análise do efeito do tratamento (C vs HS) em cada tempo experimental individualmente: **A)** O tratamento não produziu diferença; **B e C)** #HS12h vs C12h; \*HS24h vs C24h p< 0,05.

Considerando a resposta alterada na tolerância à glicose no GTT realizado 12 horas após o choque térmico e a possibilidade de ligação da HSP70 com a insulina circulante, mensurou-se a insulinemia de ambos os grupos experimentais (C e HS) no período de 30 e 120 minutos após a administração de glicose (GTT realizado 12 horas pós-choque). Os animais submetidos ao choque térmico apresentam maior concentração de insulina, em comparação ao respectivo grupo controle no período de 30 minutos após a administração de glicose. O nível de insulina detectado ( $753 \pm 106$  pM) no plasma do grupo submetido ao choque térmico encontra-se próximo aos níveis máximos normais (100-800 pM) deste hormônio na circulação. Após 120 minutos desde a sobrecarga de glicose, a insulinemia não difere entre os grupos HS e C, e é menor em relação ao período de 30 minutos após administração de glicose (Figura 16).

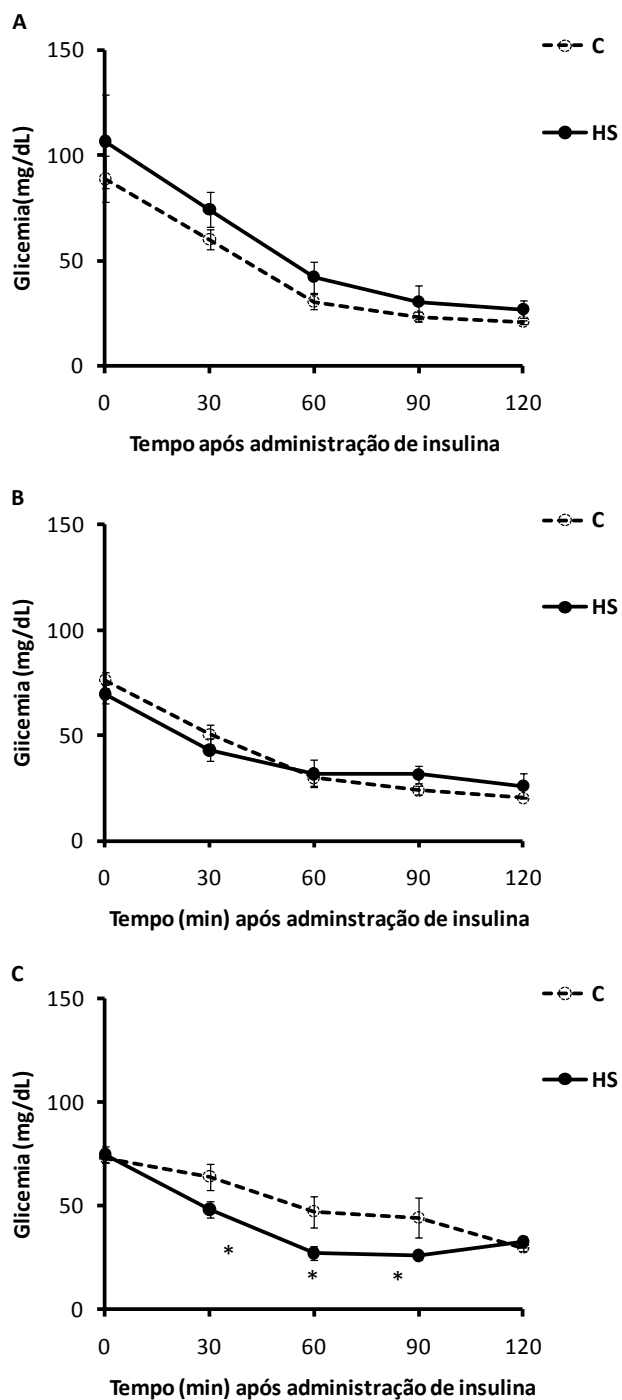


**Figura 16. Concentração plasmática de insulina durante GTT 12 h pós-choque.** Concentração plasmática de insulina (pM) durante teste de tolerância à glicose realizado no tempo experimental 12 horas pós-choque térmico. Grupos experimentais: Controle (C) e Choque Térmico (HS). Animais em condição de jejum de 12 horas. Mensuração por imunoenensaio enzimático (Kit *Cayman Chemical*). Dados expressos média  $\pm$  epm,  $n=3-4$ . Análise de Variância seguida do Teste Tukey: \* C30 min vs HS30 min; # C120 min vs C30 min; \*\*HS120 min vs HS30 min  $p<0,05$ .

No intuito de avaliar a resposta à insulina após uma sessão de choque térmico, também foram realizados testes de tolerância à insulina (IPITT 1 UI/kg), para os quais foi utilizada insulina de ação rápida (Humalog- Lispro), o que explica o rápido declínio da glicemia em todos os grupos tratados com o hormônio exógeno. Não foi evidenciada diferença na resposta dos animais do grupo HS quando comparado ao grupo controle, aos testes de tolerância à insulina quando os mesmos foram realizados 06 e 12 horas pós-choque térmico (Figura 17A e 17B).

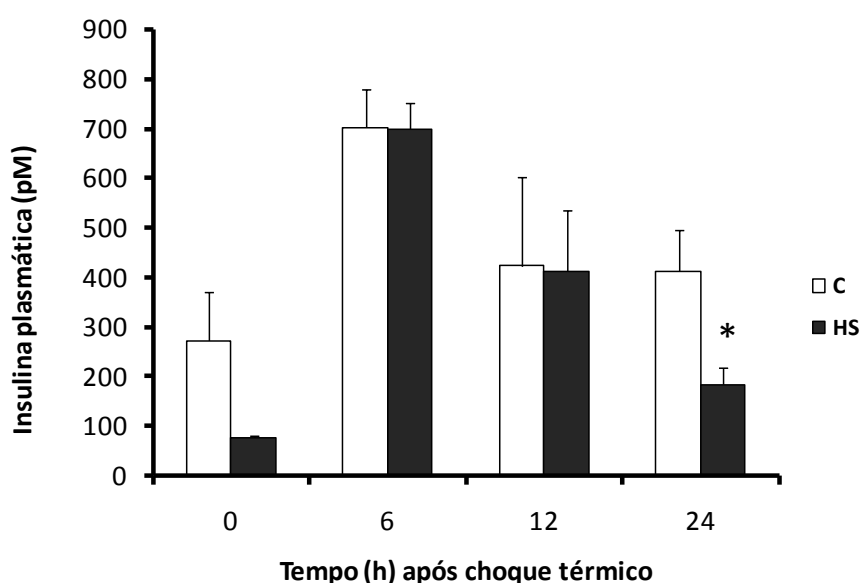
No entanto, quando o teste de tolerância à insulina foi realizado 24 horas após o choque térmico (Figura 17C), a resposta dos animais é diferente, ou seja, os animais apresentam declínio mais acentuado na glicemia a partir de 30 minutos após a administração de insulina.





**Figura 17. Testes de tolerância à insulina realizados nos tempos experimentais de 06, 12 e 24 horas pós-choque térmico.** Teste de tolerância à insulina (IPITT, HUMALOG 01UI/Kg) realizado **(A)** 06 horas, **(B)**, 12 horas e **(C)** 24 horas após o choque térmico (41-42°C por 15 minutos) em animais na condição de jejum (de 12 horas). Grupos experimentais Controle (C) e Choque térmico (HS). Mensuração por imunoensaio enzimático. Dados expressos em média± epm, n=4 (A), n=9 (B) e n=6 (C). Análise de Variância para medidas repetidas, seguido do Teste t para comparação entre C vs HS em cada período da curva \* HS vs C p < 0,05.

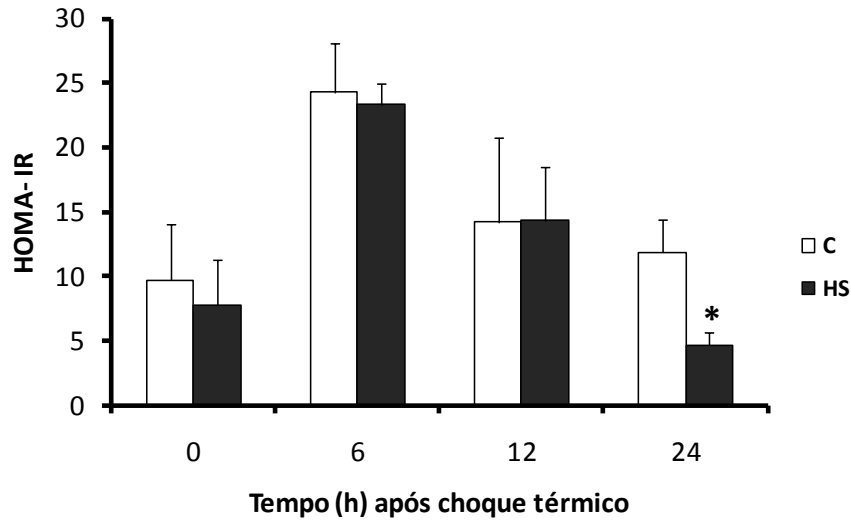
Foi avaliado, também, o parâmetro insulinemia basal de ambos os grupos experimentais, podendo-se observar que o choque térmico não causou alteração neste parâmetro nos tempos imediatamente pós-choque (tempo 0) ( $p=0,1628$ ), 06 horas ( $p=0,0814$ ) e 12 horas pós-choque ( $p=0,4816$ ). No entanto, no tempo experimental 24 horas, a insulinemia dos animais submetidos ao choque térmico é significativamente menor ( $p=0,0430$ ) do que no respectivo grupo controle (Figura 18).



**Figura 18. Concentração de insulina plasmática em diferentes tempos experimentais pós-choque térmico.** Insulina plasmática (PM) mensurada por Kit de imunoensaio enzimático (Kit *Cayman Chemical*). Grupos experimentais: Controle (C) e Choque Térmico (HS). Amostras de plasma de animais submetidos a jejum de 12 horas. Dados expressos em média $\pm$ epm,  $n=4$ . Análise de Variância de duas vias, fator 1: 'tempo experimental', fator 2: tratamento 'C vs HS', seguido de Teste de Tukey: não há interação entre o tempo e o tratamento (choque térmico)  $p= 0.815$ . Teste T para análise do efeito do tratamento (C vs HS), individualmente, em cada tempo experimental: \*HS24h vs C24h,  $p<0,05$ .

A resistência insulínica foi avaliada com base na equação matemática que define o modelo de avaliação da Homeostase – Resistência Insulínica (HOMA-IR). Esse parâmetro foi calculado com base nos valores mensurados de insulina e glicose de jejum, conforme descrito em Material e Métodos. Os valores obtidos confirmam resultados anteriores que indicam que o choque térmico produz redução do valor do HOMA-IR 24 horas após

o estresse térmico, indicando uma diminuição da resistência insulínica (Figura 19). Nos demais tempos experimentais, não se observa diferença.



**Figura 19. HOMA-IR.** Modelo de avaliação da Homeostase – Resistência Insulínica (HOMA-IR) em diferentes tempos experimentais pós-choque térmico. Grupos experimentais **C**= controle e **HS**= choque térmico. Dados expressos em média±epm, n=4. Análise de Variância de duas vias, fator 1: ‘tempo experimental’, fator 2: tratamento ‘C vs HS’, seguido de Teste de Tukey: não há interação entre o tempo e o tratamento (choque térmico). Teste T para análise do efeito do tratamento (C vs HS), individualmente, em cada tempo experimental: \*HS24h vs C24h, p<0,05.

**PREDIÇÃO 2B: A administração de anticorpo anti-HSP70 deve abolir o efeito hiperglicemiante do choque térmico no tempo experimental de 12 horas pós-choque.**

Se a ligação da HSP70 com a insulina está produzindo hiperglicemia mais pronunciada durante o teste de tolerância à glicose no período de 12 horas após o choque térmico, a administração de anticorpo anti-HSP72/73, antes da realização do teste de tolerância à glicose, deve abolir esse efeito hiperglicemiante do choque térmico.

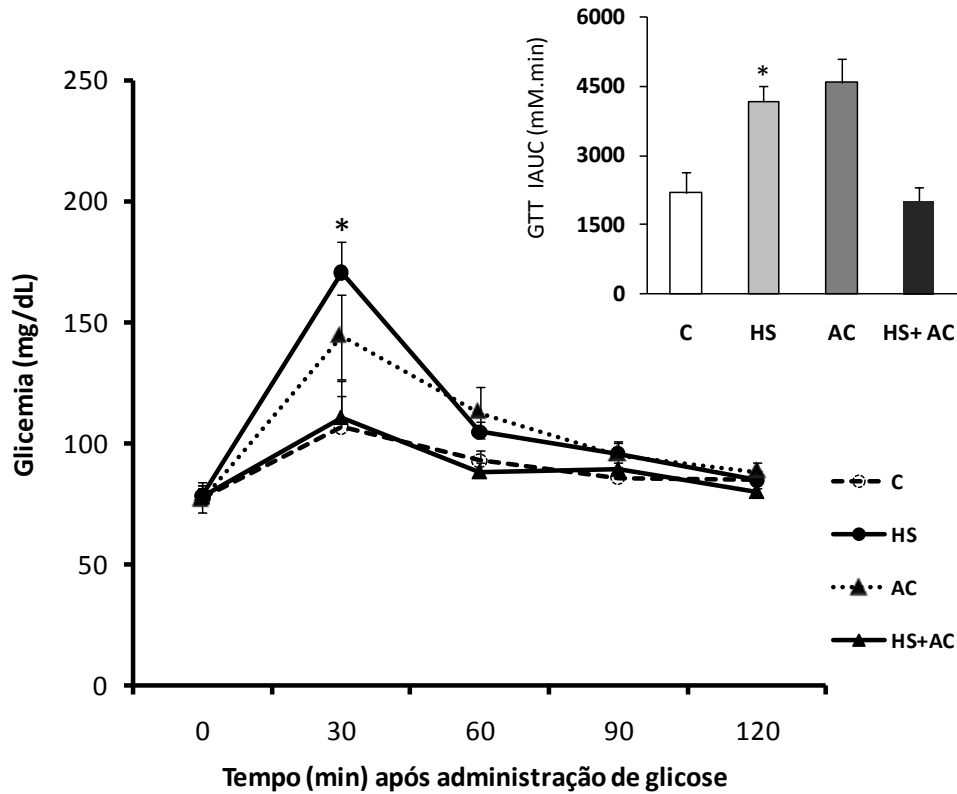
**RESULTADOS RELATIVOS À PREDIÇÃO 2B:**

Este ensaio experimental foi realizado utilizando-se o anticorpo anti-HSP70 (3A3 da Santa Cruz, SC-32239, que também reconhece ambas as formas principais de HSP70), sendo administrado duas horas antes da realização do teste de tolerância à glicose, que foi realizado nas mesmas condições experimentais. Os resultados são apresentados na Figura 13B, ou seja, IPGTT 12 horas pós-choque térmico com animais em condição de jejum.

Os resultados deste ensaio, além de mostrarem novamente que o pico glicêmico ocorrido 30 minutos após a administração de glicose é maior nos animais submetidos ao choque térmico, confirmam a predição 2B, ou seja, quando o anticorpo anti-HSP70 é administrado antes do GTT, o efeito do choque térmico sobre a glicemia é suprimido (Figura 20). O aumento da glicemia dos animais do grupo HS, após administração de glicose, é de 92,2 mg/dL; porém, nos animais do grupo HS+AC, ou seja, no grupo que recebeu anticorpo anti-HSP70 antes do GTT, o aumento foi de apenas 33 mg/dL, o que corresponde a uma diferença de cerca de 59 mg/dL de glicose circulante a menos no grupo HS+AC, não obstante a mesma dose de glicose e o mesmo estresse térmico.

Os valores da área incremental sob a curva indicam diferença significativa na resposta dos animais submetidos ao choque térmico quando comparados ao grupo controle e ao grupo que recebeu tratamento com anticorpo anti-HSP70 e choque térmico. O valor da área sob a curva dos animais que receberam anticorpo anti-HSP70 e

choque térmico não são diferentes do valor da IAUC do grupo controle, ou seja, do grupo não submetido ao choque térmico.



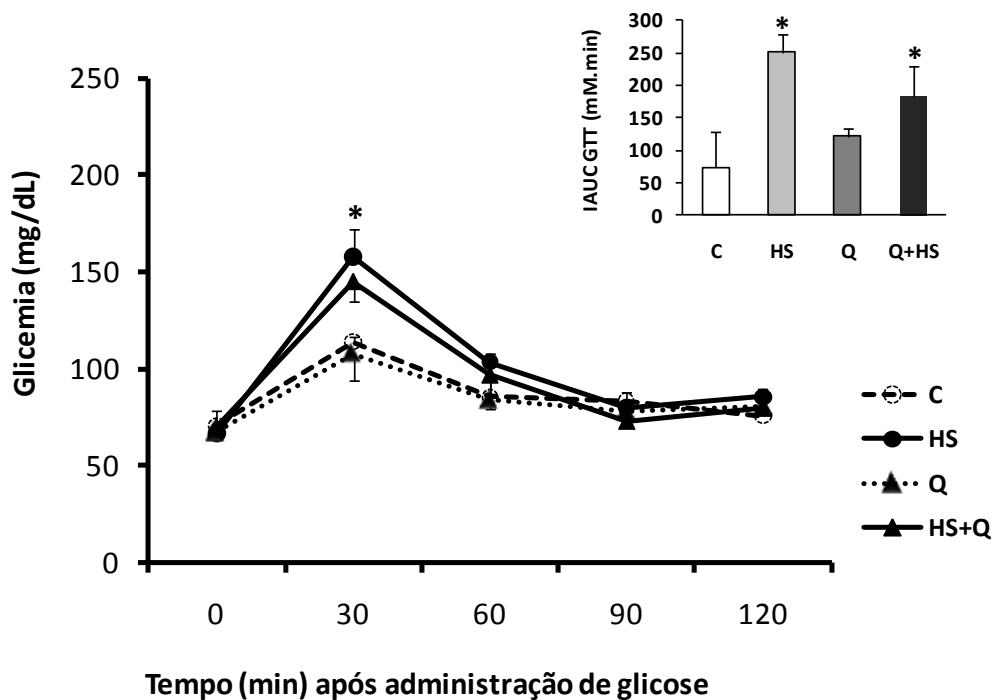
**Figura 20. Teste de tolerância à glicose realizado no tempo experimental 12 horas pós-choque térmico, com e sem anticorpo anti-HSP70.** Teste de tolerância à glicose (IPGTT, 1g/kg) realizado no tempo experimental 12 horas pós-choque térmico, com e sem anticorpo anti-HSP70 (3A3 Santa Cruz, SC-32239) administrado 2h antes do choque térmico. Na parte superior/inferior, respectiva área incremental sob a curva (IAUC). **Grupos experimentais:** Controle (C), Choque Térmico (HS), anticorpo anti-HSP70 (AC) e choque térmico+anticorpo anti-HSP70 (HS+AC). Glicemia mensurada com glicosímetro (*Optium Xceed da Abbott*) por punção caudal distal. Dados expressos em média± epm, n=5-6 por grupo. Análise de Variância para medidas repetidas (curva glicêmica), seguido do Teste de Tukey (IAUC -4 grupos) e Teste T (CxHS em cada período) \* HS vs. HS+AC e vs. C p<0,05.

**PREDIÇÃO 2C: Se os efeitos do choque térmico dependem da síntese *de novo* de moléculas de HSP70, então, a administração de quercetina antes do choque deve suprimir o efeito hiperglicemiante do choque térmico.**

Se a ligação da HSP70 com a insulina na circulação depende da síntese *de novo* de moléculas de HSP70 para o estabelecimento do quadro de maior pico glicêmico durante o GTT, 12 horas depois do choque térmico, a administração de quercetina, um bloqueador da expressão de HSP70, antes do choque térmico, deve abolir o efeito hiperglicemiante da eHSP70 plasmática.

#### **RESULTADOS RELATIVOS À PREDIÇÃO 2C:**

Os resultados deste conjunto de experimentos mostraram que a quercetina, em dose capaz de bloquear completamente a síntese de novas moléculas de HSP70 (200 mg/kg *p. os*), não bloqueou o efeito hiperglicemiante do choque térmico quando os animais foram submetidos ao GTT 12 h após o tratamento térmico (Figura 21).



**Figura 21. Teste de tolerância à glicose em animais tratados com quercetina.** Teste de tolerância à glicose (IPGTT, 1g/kg) realizado no tempo experimental 12 horas pós-choque térmico, com e sem tratamento prévio com Quercetina (Q), administrada 1 h antes do choque térmico, por gavagem gástrica à dose de 200 mg/kg veiculada em água. Glicemia mensurada com glicosímetro (*Optium Xceed da Abbott*) por punção caudal distal. Dados expressos em média±epm, n=4 por grupo. Análise de variância para medidas repetidas (curva glicêmica), seguido do Teste de Tukey (IAUC -4 grupos) e Teste T (CxHS em cada período) \* HS30' e HS+Q30' vs C30' p<0,05

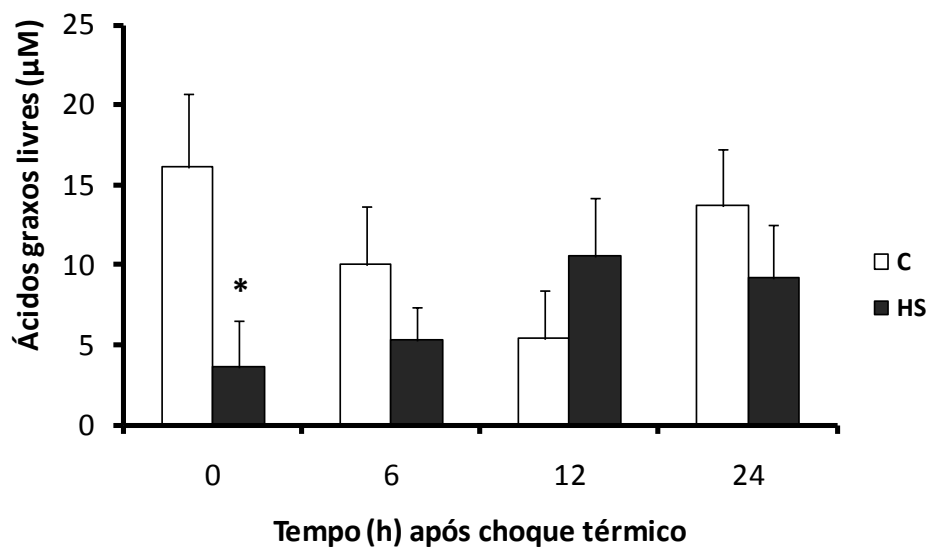
**PREDIÇÃO 2D: Se a concentração de ácidos graxos livres (AGL) estiver maior na situação de 12 horas após choque térmico, poderia explicar o porquê do aumento de concentração de glicose circulante.**

A mensuração dos ácidos graxos livres foi realizada com amostras de plasma de animais submetidos ao choque térmico e animais controle em diferentes tempos experimentais, utilizando-se análise colorimétrica quantitativa com kit específico (ver Material e Métodos). A análise estatística relativa aos valores obtidos foi precedida da transformação dos mesmos utilizando-se a equação  $(\sqrt{x+0,5})$  devido à variabilidade dentro de cada grupo experimental.

#### **RESULTADOS RELATIVOS À PREDIÇÃO 2D:**

Os valores relativos à concentração de ácidos graxos indicam que logo após o choque térmico (Tempo 0 pós-choque), há menor concentração destas moléculas na circulação dos animais submetidos ao choque térmico quando comparado ao respectivo grupo controle (Figura 22). Contudo, esta diferença não é observada nos demais tempos pós-choque térmico (06,12 e 24 horas).





**Figura 22. Concentração de ácidos graxos livres no plasma, em diferentes tempos experimentais pós-choque térmico.** Concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres ( $\mu\text{M}$ ) em diferentes tempos experimentais pós-choque térmico. Mensuração por Kit *BioAssay Systems* (Colorimétrico Quantitativo). **Grupos experimentais:** Controle (C) e Choque Térmico (HS). Dados transformados ( $\sqrt{x + 0,5}$ ) em paramétricos e expressos em média $\pm$ epm, n=4. Análise de Variância de duas vias, fator 1: 'tempo experimental', fator 2: tratamento 'C vs HS', seguido de Teste de Tukey: não há interação entre o tempo e o tratamento (choque térmico)  $p = 0.408$ . Teste T para análise do efeito do tratamento (C vs HS), individualmente, em cada tempo experimental: \*HS0' vs.CO'  $p < 0,05$ .

**HIPÓTESE 3: Se HSP70 causa maior disponibilidade de glicose na circulação, é possível que existam tecidos *in vivo* captando menos glicose diante de uma sobrecarga glicêmica, mesmo na presença de insulina circulante.**

Considerando-se que os animais do grupo submetido ao choque térmico apresentam maior disponibilidade de glicose circulante quando submetidos a uma sobrecarga de glicose 12 horas após choque térmico (Figura 13B e 13D), há que se testar a hipótese de que existam tecidos captando menos glicose.

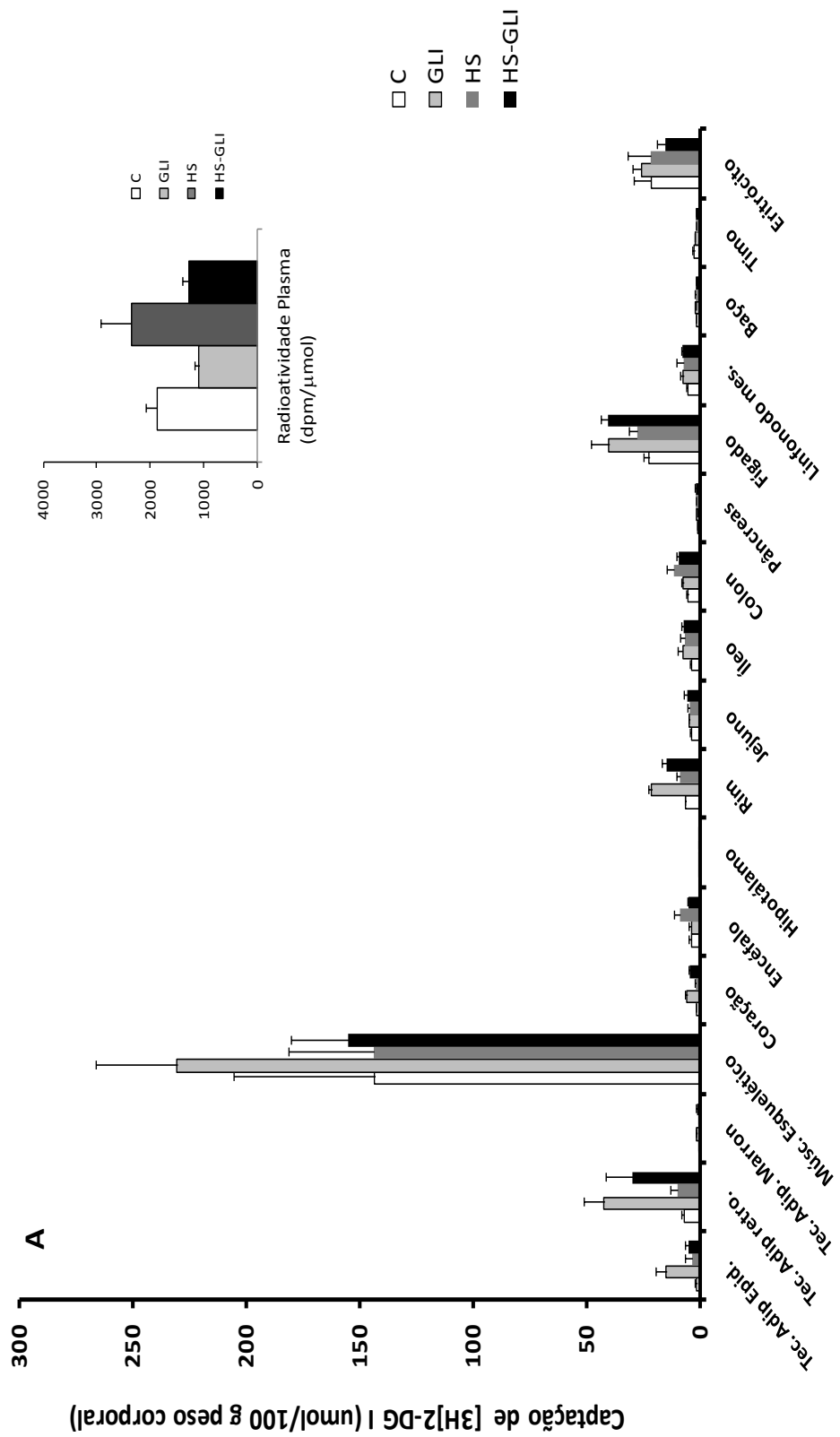
**PREDIÇÃO 3A: A captação de 2-desóxi-glicose (2DG-[<sup>3</sup>H]) deve ser menor em tecidos-chave, como o tecido adiposo e o músculo esquelético, 12 horas após o choque térmico, quando comparado aos respectivos controles.**

#### **RESULTADOS RELATIVOS À PREDIÇÃO 3A:**

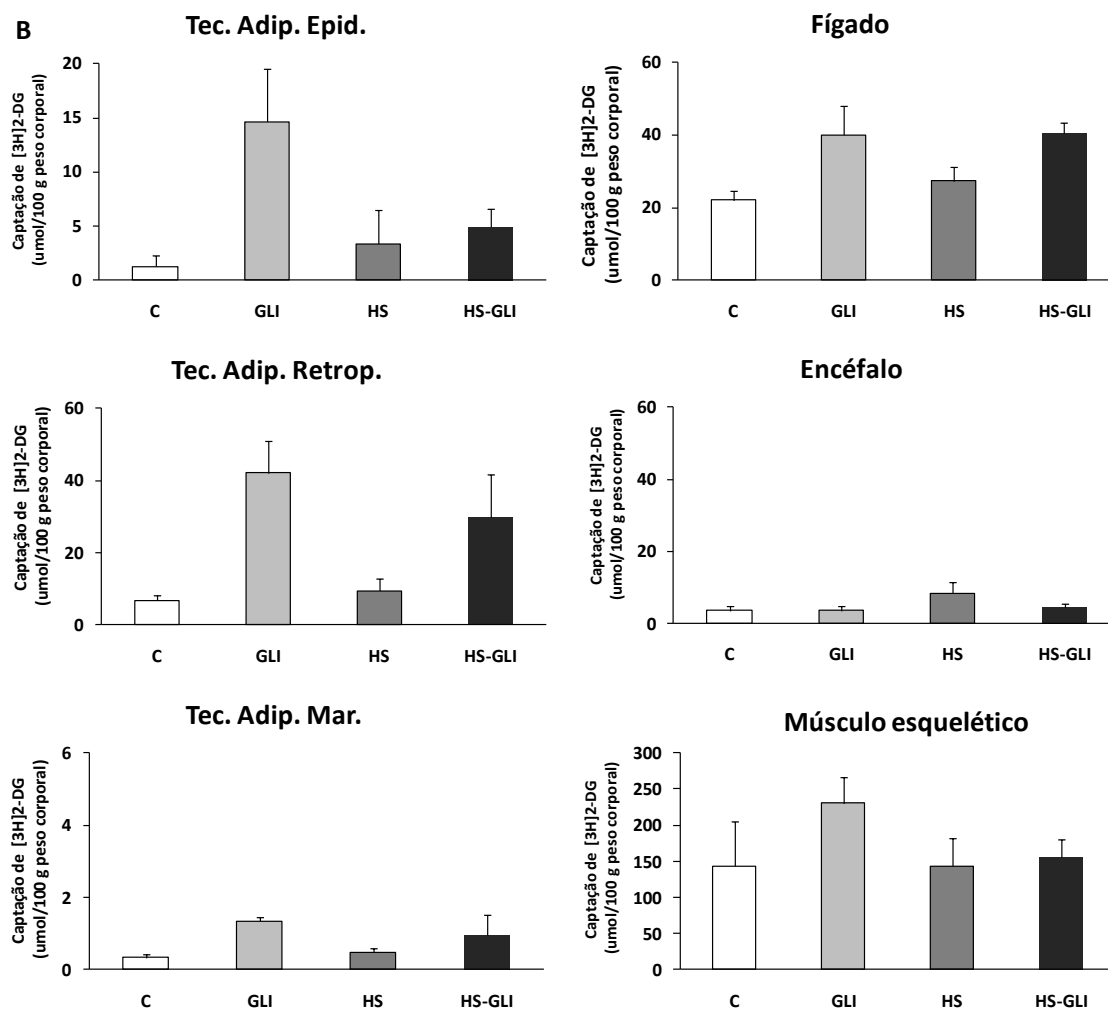
A Figura 23A apresenta os resultados da captação 2-DG em diversos tecidos **12 horas** após animais terem sido submetidos ao choque térmico. Os valores relativos à captação de 2-DG radiomarcada pelo músculo esquelético, quando expressa em  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  de peso corporal, devem ser analisados assumindo que toda a massa muscular esquelética tenha comportamento como o músculo gastrocnêmio. Os dados relativos ao conjunto dos tecidos em relação à respectiva captação de 2-DG, quando expressos em  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  de peso corporal, indicam que nenhum tecido captou mais glicose em consequência da maior oferta.

Os valores relativos à captação de 2-DG expressos em  $\mu\text{mol}/\text{grama}$  de tecido indicam a captação de glicose em cada tecido sem considerar a diferença de massa que cada um representa em relação ao peso corporal total (Figura 24A e 24B). Observa-se que dentre os principais tecidos alvo da insulina, o músculo solear e o tecido adiposo epididimal captaram menos 2-DG quando submetidos ao choque térmico. No tecido adiposo, a menor captação é observada na presença de glicose, enquanto que no

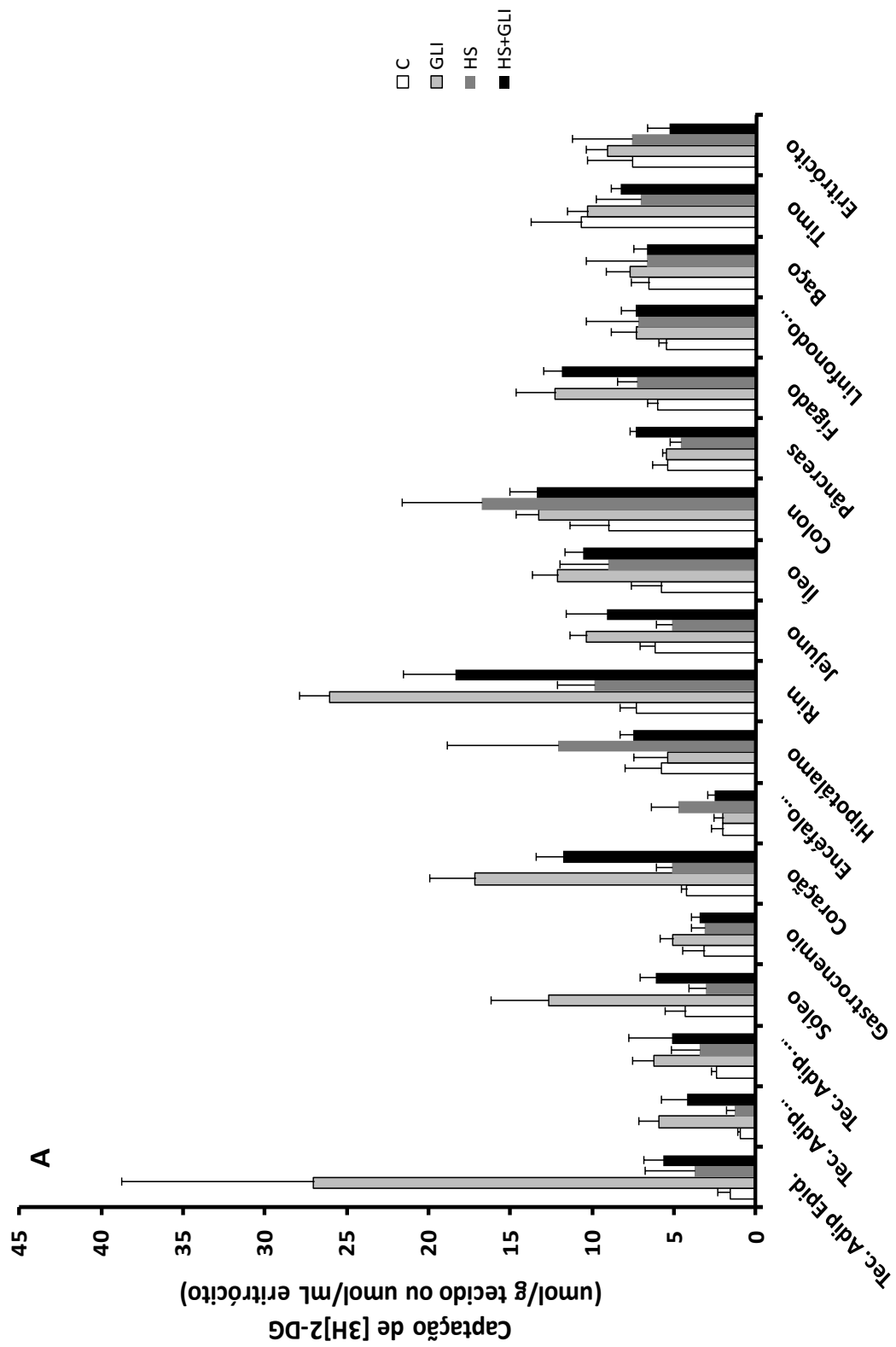
músculo, a menor captação se dá nos grupos que não receberam glicose. No fígado, no músculo gastrocnêmio e tecido adiposo retroperitoneal não houve diferença na captação de 2-DG radiomarcada (Figura 24B).



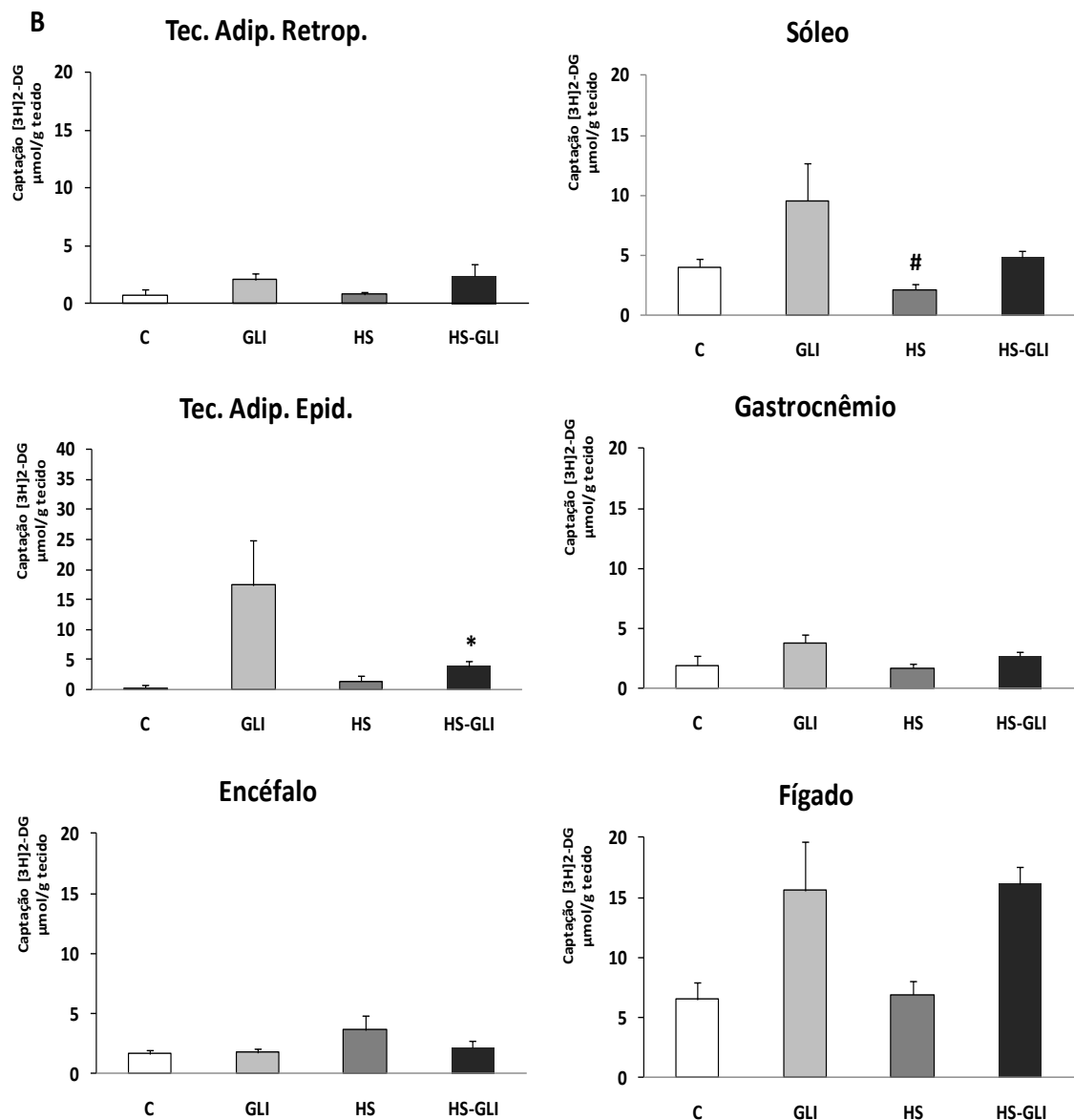
(continua)



**Figura 23. Captação de glicose ( $\mu\text{mol}/100\text{ g de peso}$ ) por tecidos de animais expostos ao choque térmico. (A) Captação de 2-DG 2[3H(N)] expressa em  $\mu\text{mol}$  para cada 100 g de peso corporal diferentes tecidos coletados 12 horas após choque térmico. Todos os animais receberam glicose radiomarcada. Em (B) alguns dos tecidos relevantes no estudo da captação de glicose, apresentados individualmente. Grupos experimentais: **C**= apenas 2-DG 2[3H(N)]; **GLI**= 2-DG 2[3H(N)] + glicose fria; **HS**= submetidos ao choque térmico + 2-DG 2[3H(N)]; **HS-GLI**= submetido ao choque térmico + 2-DG 2[3H(N)] + glicose fria. Os valores relativos ao músculo esquelético referem-se aos padrões do músculo gastrocnêmio. Análise de Variância seguida de Teste de Tukey. Dados expressos média  $\pm$  epm,  $n=3$ .**



(continua)



**Figura 24. Captação de 2-DG ( $\mu\text{mol/g}$  tecido) por tecidos de animais expostos ao choque térmico (A) Captação de [3H] 2-DG expressa em  $\mu\text{mol}$  para cada grama de tecido (ou ml de eritrócito) coletados 12 horas após choque térmico. Todos os animais receberam glicose marcada. Em (B), alguns tecidos relevantes no estudo da captação de glicose e regulação da glicemia, apresentados individualmente. Grupos experimentais **C**= apenas [3H] 2-DG; **GLI**= [3H] 2-DG + glicose fria; **HS**= submetido ao choque térmico + [3H] 2-DG; **HS-GLI**= submetido ao choque térmico + [3H] 2-DG + glicose fria. Os valores relativos ao músculo esquelético referem-se aos padrões do músculo gastrocnêmio. Análise de Variância seguido de Teste de Tukey \*HS-GLI vs GLI; #HS vs C. Dados expressos média  $\pm$  epm, n=3.**

**PREDIÇÃO 3B: A administração de HSP70 exógena deve reduzir a captação de 2-desóxi-glicose (2-DG) em tecidos-chave, como o tecido adiposo e o músculo esquelético, assemelhando-se à resposta obtida pela exposição ao choque térmico, sugerindo, assim, que a HSP72 extracelular esteja envolvida na redução da captação de glicose.**

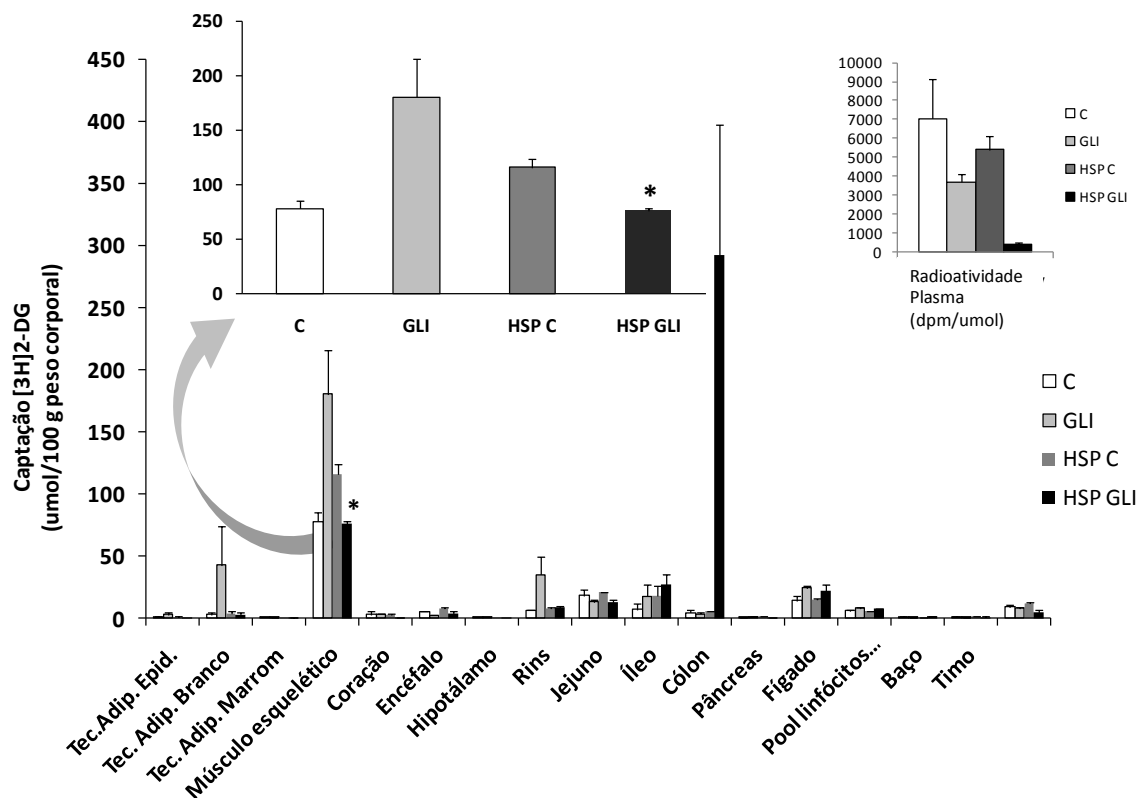
Os ensaios de captação de 2-DG radiomarcada foram realizados com a administração de doses de HSP72 (HSP70-A1 recombinante), injetada endovenosamente, tais que as concentrações plasmáticas atingissem 1 ng/mL (13.9 pM). A coleta de material foi realizada 12 horas após administração de HSP70.

#### **RESULTADOS RELATIVOS À PREDIÇÃO 3B:**

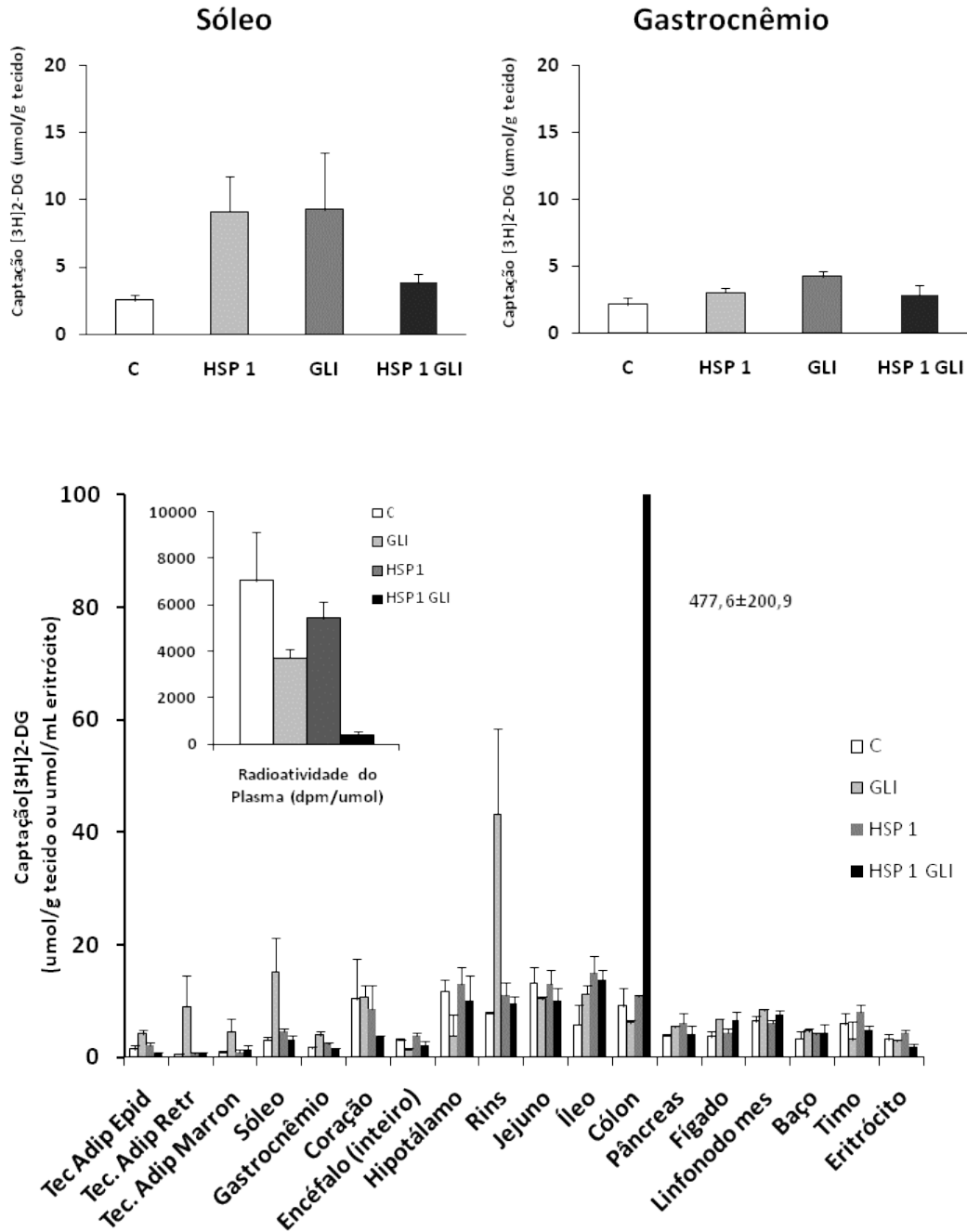
As Figuras 25 e 26 mostram os resultados da captação de 2-DG em diversos tecidos coletados 12 horas após os animais terem recebido HSP70 (HSP70-A1) via endovenosa em doses em que a respectiva concentração plasmática atingisse 1 ng/mL (13.9 pM). Os resultados mostram que 12 horas após a administração de HSP70 o músculo esquelético (padrão gastrocnêmio), capta menos glicose e, surpreendentemente, as porções mais distais do intestino captam mais glicose. Não pode ser desconsiderada a ocorrência de algum artefato da técnica de preparo do tecido ou medida de radioatividade.

A captação de 2-DG radiomarcada/grama de tecido pode ser visualizada na Figura 26, mostrando quanto cada tecido captou das substâncias radiomarcada. Não se observa resultado diferente daquele descrito anteriormente.





**Figura 25. Captação de glicose por tecidos de animais que receberam HSP70-A1 de modo que as concentrações plasmáticas atingissem 1 ng/mL (13.9 pM), expresso em  $\mu\text{mol}/100\text{ g de peso corporal}$ .** Captação de [3H] 2-DG ( $\mu\text{mol}/100\text{g de peso corporal}$ ) em tecidos de animais submetidos à administração exógena de HSP70-A1 (Enzo Life Sciences) em dose equivalente à circulação plasmática de 1ng/ml de HSP70. Grupos experimentais: **C**= apenas [3H] 2-DG; **GLI**= [3H] 2-DG + glicose fria; **HSP C**= HSP70-A1+ [3H] 2-DG; **HSP GLI**= HSP70-A1 + [3H] 2-DG + glicose fria. Os valores relativos ao músculo esquelético referem-se aos padrões do músculo gastrocnêmio. Análise de Variância seguida de Teste de Tukey. Dados expressos média  $\pm$  epm, n=2-4.



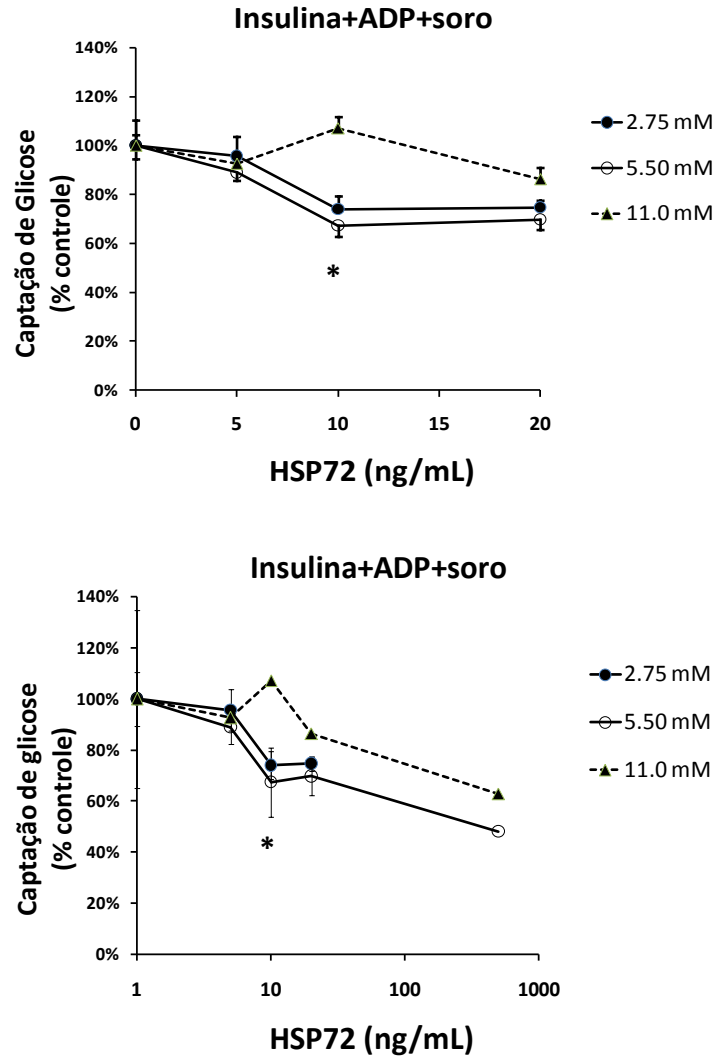
**Figura 26. Captação de glicose por tecidos de animais que receberam HSP70-A1 de modo que as concentrações plasmáticas atingissem 1 ng/mL (13.9 pM), expresso em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido.** Captação de [3H] 2-DG ( $\mu\text{mol/g}$  de tecido) em tecidos de animais submetidos à administração (via EV) exógena de HSP70-A1 (Enzo Life Sciences) em dose equivalente à circulação plasmática de 1ng/ml de HSP70. Grupos experimentais: **C**= apenas [3H] 2-DG; **GLI**= [3H] 2-DG + glicose fria; **HSP1**= HSP70-A1 + [3H] 2-DG; **HSP1 GLI**= HSP70-A1 + [3H] 2-DG + glicose fria. Análise de Variância seguida de Teste de Tukey. Dados expressos média  $\pm$  epm, n=2-4

**PREDIÇÃO 3C: Se a HSP72 (ou o choque térmico) está provocando alteração na tolerância à glicose por uma ação independente de insulina sobre o músculo, então, a HSP72 não deve influir na captação de 2-DG [<sup>14</sup>C] por músculo solear isolado, incubado na presença ou ausência de insulina.**

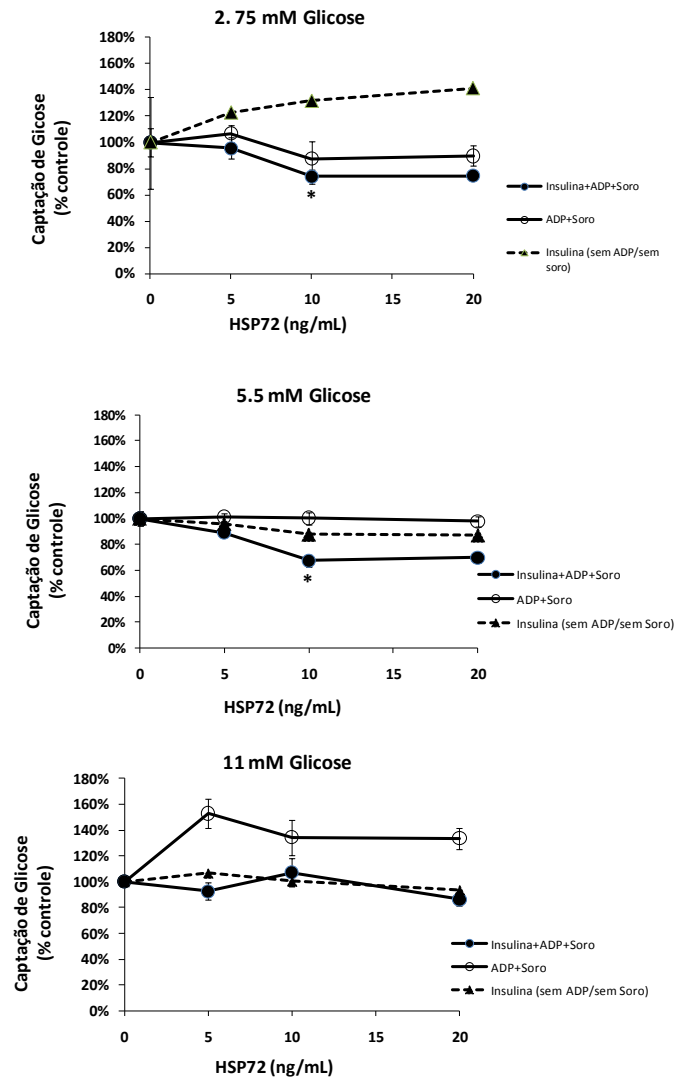
Caso a HSP72 diminua a captação de 2-DG, não se pode descartar a possibilidade de um efeito desta proteína de choque térmico diretamente sobre a insulina ou ainda sobre o músculo por algum mecanismo diverso daquele da ligação ao hormônio. Se, no entanto, a redução da captação ocorrer tanto na presença de insulina quanto em sua ausência, não se pode afirmar que o efeito da HSP72 ocorra por ligação à insulina.

#### **RESULTADOS RELATIVOS À PREDIÇÃO 3C:**

Os experimentos de incubação com músculo solear demonstram que, na presença de concentrações fisiológicas de glicose de jejum (5,5 mM), a HSP72 reduz a captação de 2-DG **apenas** na presença de insulina (de uma maneira dose-dependente com máximo a 10 ng/mL = 139 pM de HSP72, ou seja, o dobro da concentração molar de insulina utilizada), como mostrado nas Figuras 27 e 28. Isto significa que essa inibição é insulino-dependente, além de ser dependente de algum fator presente no soro (dialisado) do próprio animal em experimentação, visto que a remoção do soro e do ADP abolem esse efeito (ver sinopse na Figura 28). Destaca-se que a eHSP72 produz este efeito na presença de insulina e com concentrações de glicose de jejum ou hipoglicemia (5,5 mM e 2,75 mM e, respectivamente). Quando a concentração de glicose é 11 mM, a HSP72 não tem efeito na presença de insulina.



**Figura 27. Captação de glicose em experimentos de incubação com músculo solear isolado.** Captação de glicose na presença de Insulina (Regular) + ADP + soro autólogo dialisado e diferentes concentrações de HSP70 em três condições glicêmicas (2,75, 5,5 e 11,0 mM). Dados expressos como média±epm, n=3-6 (2,75 mM), n=7-9 (5,5 mM), n=2-24 (11mM). Dados expressos como média±epm. Análise de Variância para medidas repetidas seguido de Teste de Tukey, \*HSP72 0 e 1 ng/ml vs. HSP72 10 ng/ml  $p < 0,05$ .



<b>Sinopse</b>			
Insulina	+	+	-
ADP/Soro	+	-	+
<b>Glicose (mM)</b>	<hr/>		
<b>2.75</b>	↓até 26%	↑até 41%	↓até 12%
<b>5.50</b>	↓até 33%	não afeta	não afeta
<b>11.0</b>	não afeta	não afeta	↑até 53%

**Figura 28. Captação de glicose em experimentos de incubação com músculo solear isolado em várias condições experimentais.** Captação de glicose na presença/ausência de Insulina (Regular) + ADP + soro autólogo dialisado e diferentes concentrações de HSP70 em três condições glicêmicas (2.75, 5.5 e 11,0 mM). Dados expressos como média±epm, n=3-6 (2,75 mM), n=7-9 (5,5 mM), n=2-24 (11mM).. Análise de Variância seguido de Teste de Tukey, \*HSP72 0 ng/ml VS. HSP72 10 ng/ml do grupo Insulina+ADP+Soro p<0,05.

# DISCUSSÃO

---

Situações de estresse metabólico, como a hipoglicemia e o choque térmico, são eventos em que o organismo revela sua capacidade de defesa e de ajuste fisiológico homeostático. Considerando-se sua minuciosa seleção no processo evolutivo, as proteínas de choque térmico (HSPs) têm papel fundamental e de destaque por desempenharem função de defesa-chave com objetivo citoprotetor em diferentes situações de estresse celular (MORIMOTO *et al.*, 1990). Por isso, frequentemente as HSPs são descritas como proteínas de estresse.

Muito embora o registro da ocorrência de HSP70 na circulação tenha sido descrito no final dos anos 80 (HIGHTOWER & GUIDON 1989; POCKLEY *et al.* 1998), suas funções extracelulares ainda não estão totalmente esclarecidas. O aumento da concentração de eHSP70 na circulação ocorre em situações em que o organismo é exposto ao estresse, como infecções/sepses (GELAIN, 2011) e exercício físico (WALSH *et al.* 2001). Em nosso trabalho, observamos a ocorrência de eHSP70 plasmática em condições de choque térmico (estresse por hipertermia) e hipoglicemia (jejum + insulina), e investigamos a possibilidade de interação/associação da eHSP70 plasmática com o hormônio insulina e sua implicação na disponibilidade de glicose circulante e sobre a captação tecidual de glicose.

O modelo de choque térmico tem sido utilizado em experimentos pré-clínicos e clínicos de investigação acerca do papel da HSP70 na resistência à insulina. Entre eles, Chung e colaboradores (2008), do Laboratório do Prof. Mark Febbraio da Austrália, utilizaram um modelo de choque térmico crônico (terapia de choque térmico) para avaliar o efeito da HSP70 sobre a resistência insulínica, expondo os animais a uma sessão semanal de choque térmico, durante 16 semanas, com temperatura de 41,5 °C e duração de 15 minutos, estando os animais anestesiados. Nosso estudo foi desenvolvido com modelo de choque térmico agudo, ou seja, somente uma sessão de choque térmico (água a 42 °C), com duração de 15 minutos, para indução de hipertermia (41,5 °C) com animais anestesiados (para o bloqueio do controle central da temperatura). O protocolo

experimental previu também que os animais do grupo controle fossem anestesiados já que a anestesia também se constitui em condição de estresse que poderia interferir na liberação de HSP70. Os resultados relativos ao conteúdo de HSP70 extracelular demonstram que a condição experimental utilizada causou liberação de HSP70 para a circulação, cuja presença foi constatada tanto na forma constitutiva (HSC70 ou HSP73) quanto induzível (HSP72) da proteína. Analisamos a concentração destas proteínas em diferentes períodos após o evento do choque térmico, o que denominamos de tempo experimental (ou de recuperação pós-choque), e observamos a presença de HSP72 e HSP73 circulante no período imediatamente após e nos períodos de recuperação de 06, 12 e 24 h pós-choque térmico (Figura 15).

Apesar de não observarmos efeito da interação do tratamento com o tempo sobre a concentração plasmática de HSP72 e HSP73, o efeito do tratamento (choque térmico) sobre a concentração plasmática destas proteínas, em cada tempo experimental distintamente, indica que nos tempos mais tardios (12 e 24 horas após o choque térmico) há diferença na concentração plasmática de HSP73 e HSP70 total entre o grupo submetido ao choque térmico e seu respectivo controle (Figuras 15B e 15C).

A ocorrência de eHSP70 na circulação estimulada por estresse tem sido relatada em diferentes investigações realizadas com animais e seres humanos submetidos a eventos ou condições estressantes. Semelhante ao que verificamos em nosso estudo, Walsh e colaboradores (2001) constataram aumento rápido da concentração plasmática de HSP72 em indivíduos submetidos a exercício físico (corrida de 60 minutos em esteira), nos tempos de 30 a 60 minutos após a atividade física com concentrações detectáveis de HSP72, apesar de iguais aos da condição de repouso, até 24 horas após o estímulo (exercício). Ainda, verificaram aumento na expressão do RNAm desta proteína no músculo somente 2 horas depois do exercício, ou seja, cerca de 1 hora e meia depois de ter sido detectado o aumento da sua concentração plasmática, o que sugere que a sua liberação tenha se dado por outro tecido que não o músculo em atividade e/ou que a liberação desta proteína se dê a partir de estoque intracelular. Tal fato pode reforçar a ideia de que esta proteína tenha um papel importante na circulação, uma vez que sua liberação ocorre prontamente logo após a exposição a uma situação de estresse.

Curiosamente, a diferença na concentração de HSP70 entre os animais submetidos ao choque térmico e os respectivos controles foi observada somente em relação à forma constitutiva (HSP73), o que pode sugerir alguma função/ação distinta das formas (constitutiva e induzível) destas proteínas, quando presentes na circulação. A HSP73 e a HSP72 são frequentemente consideradas como tendo funções celulares semelhantes, apesar de existirem indicativos de que as funções intracelulares destas proteínas homólogas, mas não idênticas, possam ser diferentes e dependentes da concentração (GOLDFARB *et al.*, 2005).

Embora tenha sido demonstrado que eventos estressores, em que pode haver risco ou ocorrência efetiva de dano ao organismo, possam causar a liberação da HSP70 para a circulação, os sinais endógenos responsáveis por mediar a liberação desta proteína do estresse ainda não são completamente conhecidos. Neste sentido, é importante mencionar alguns estudos desenvolvidos acerca deste assunto. Febbraio e colaboradores (2004) mostraram que a ingestão de glicose é capaz de atenuar a liberação hepatoesplâncica de HSP72 para a circulação (induzida por exercício), e de que a queda pode ser devida à redução do estresse hepático produzida pela ingestão de glicose. Johnson e colaboradores (2005), ao examinarem a implicação de neuro-hormônios e hormônios do estresse (catecolaminas, ACTH e glicocorticoides) sobre a liberação de HSP70 durante o estresse, observaram que o sistema  $\alpha_1$ -adrenérgico está envolvido na liberação desta proteína do estresse na circulação, acrescentando novo e importante elemento regulador da liberação de HSP72 para a circulação: a resposta simpática ao estresse.

Indaga-se neste contexto: qual a relação, durante situações estressantes, entre a liberação de eHSP72 para o plasma, o sistema nervoso simpático e a concentração de glicose circulante? Neste sentido, passamos a investigar a possibilidade de ligação entre a HSP70 e a insulina, uma vez que as HSP70 são chaperonas moleculares no meio intracelular, e poderiam desempenhar, também, a função de 'acompanhantes' na circulação. Os resultados obtidos a partir de experimentos *in silico* indicam a ocorrência de ancoragem e ligação da insulina ao sítio de ligação de peptídeos das HSP70 (Figura 5). A propriedade de ligação da HSP70 com outras proteínas caracteriza sua função *chaperona* (intracelular) e transportadora de moléculas como peptídeos antígenos



(extracelular) (HENDERSON, 2010). Outros ensaios moleculares realizados com HSP70 de *Escherichia coli* (DnaK) e moléculas de pró-insulina também apontam regiões de ligação da HSP70 (DnaK) na molécula de pró-insulina, indicando a possibilidade de ligação entre estas duas proteínas (BURKAT, *et al.*, 2010).

Diante dos resultados dos ensaios *in silico*, que estabelecem a possibilidade real de que a ligação entre a HSP70 e a insulina ocorra *in vivo* na circulação, foram realizados testes de imunoprecipitação com amostras de plasma de animais previamente submetidos a diferentes condições glicêmicas (alimentados, em jejum de 6 e de 15 horas, com e sem tratamento de insulina Regular e Detemir). As amostras de plasma foram imunoprecipitadas contra a insulina com anticorpo específico e, após a reação imunológica, submetidas à eletroforese nativa. Quando reveladas, mostraram coimunoprecipitação de HSP70 (Figura 8). Parte das mesmas amostras foi submetida à quantificação de HSP72 (Figura 9), cujos resultados mostram elevada concentração desta proteína de choque térmico durante a hipoglicemia induzida por insulina.

Outros ensaios de imunoprecipitação com HSP70 recombinante e insulina (biotinilada e fria) em soro fetal bovino, preparados para confirmar a coimunoprecipitação das duas proteínas, revelam e confirmam a coimunoprecipitação de HSP70 (Figura 10). Além disso, foram preparados experimentos substituindo-se a técnica de revelação das proteínas pós-eletroforese pela simples reação com estreptavidina conjugada com peroxidase (estreptavidina-HRP), que se liga fortemente a proteínas biotiniladas, com os respectivos resultados indicando, novamente, que a HSP70 coimunoprecipita com a insulina. Os experimentos de competição revelam marcação decrescente nas bandas onde maiores quantidades de insulina fria foram coincubadas, com uma constante de dissociação de valor na faixa de 1 pM (Figura 12).

Estes resultados, em conjunto, confirmam a abordagem teórica de interação entre as moléculas de Insulina e eHSP70 na circulação. Assim, torna-se pertinente e importante entendermos o papel fisiológico desta ligação *in vivo*. Cerca de 50% do conteúdo de insulina na circulação portal são removidos durante sua passagem pelo fígado; mas esse percentual varia amplamente em diferentes condições, ou seja, a captação hepática de insulina é influenciada tanto por fatores fisiológicos como patológicos, e envolve diferentes sistemas e controles; porém, sua remoção da

circulação não implica sua destruição imediata. Uma quantidade significativa de insulina associada ao receptor é liberada a partir da célula (hepática e muscular), e volta para a circulação. Estima-se que a degradação de uma única molécula de insulina leve cerca de 70 minutos desde sua liberação na circulação (DUCKWORTH et al., 1998).

Neste contexto, conjecturamos que a eHSP70 na circulação, liberada por situações de estresse metabólico e térmico, ligue-se à insulina circulante impedindo-a de agir enquanto persistir a condição de estresse e de risco. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que, durante situações de estresse, os sistemas fisiológicos operam no sentido de aumentar a disponibilidade de glicose plasmática. Outrossim, tendo sido a HSP70 minuciosamente selecionada e mantida extremamente conservada durante a evolução dos vertebrados, não se pode descartar a possibilidade de que esta classe de proteínas tenha participado da evolução do sistema de controle metabólico durante situações de fuga ou luta dos animais, e possa representar importante via de defesa e prevenção contra a hipoglicemia e o consequente dano tecidual, mediado pela sistema nervoso noradrenérgico (via receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos).

Concentrações reduzidas de glicose sanguínea são detectadas por receptores encefálicos e sensores da veia porta hepática, cujos sinais provocam ativação do sistema simpático. O sistema nervoso simpático desempenha papel preponderante na resposta contrarregulatória a insulina, estimulando a secreção de glucagon e inibindo a secreção de insulina. A ativação do sistema simpatoadrenal também induz à liberação de adrenalina no sangue. A liberação deste hormônio, do cortisol e do glucagon maximiza a mobilização de glicose no corpo, garantindo a manutenção da glicemia nos períodos de jejum e em outras situações de estresse (LAGER, 1991).

Neste sentido, é importante considerar possíveis efeitos da ativação simpática, da liberação de adrenalina e da ativação do eixo CRH-ACTH-glicocorticoide sobre a liberação de HSP70 para a circulação. Johnson e colaboradores (2005) estudaram a mediação do eixo hipófise-adrenal e do sistema nervoso simpático, responsáveis pela defesa e alarme diante de situações de estresse, sobre a liberação de HSP70 para a circulação, e observaram que a remoção das glândulas adrenais e a ausência do ACTH na circulação não interferem na liberação de HSP72 para a circulação, indicando que o eixo ACTH-glicocorticoide não está diretamente envolvido na liberação de HSP72 para a

corrente sanguínea. Por outro lado, foi observado que o tratamento dos animais com antagonistas adrenérgicos bloqueou a liberação de HSP72 induzida por estresse, indicando que a resposta simpática ao estresse está envolvida na indução da exportação de HSP72 para a circulação. Assim, poderíamos supor que a eHSP70 no plasma, como proteína do estresse, constitui parte da resposta contrarregulatória à insulina mediada pelo sistema simpático.

Contudo, há que se considerar também a possibilidade de que a ligação da insulina com a HSP70 possa ocorrer na perspectiva de manter o hormônio circulante, porém indisponível para agir enquanto a oferta de glicose circulante for reduzida. Neste caso, a ligação da insulina com a HSP70 configuraria uma reserva circulante do hormônio para situações de emergência.

Testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT) foram realizados no intuito de investigar o papel fisiológico da ligação entre HSP70 e a insulina em condições *in vivo*. Estes testes foram realizados durante diferentes períodos (6, 12 e 24 horas) de recuperação pós-choque térmico, que denominamos de 'tempos experimentais'. Os resultados dos testes de tolerância à glicose mostraram que o choque térmico causa efeito hiperglicemiante mais acentuado (30 minutos após a injeção de glicose) quando comparado ao grupo controle, com disponibilidade de glicose circulante cerca de 30% maior, apesar de ambos os grupos terem sido submetidos à mesma carga de glicose e o mesmo tempo de jejum (12 horas). Portanto, os animais submetidos ao choque térmico parecem apresentar menor capacidade de restabelecimento da glicemia após uma sobrecarga de glicose e/ou menor utilização/captação periférica de glicose, quando estão no período de recuperação do choque térmico. Esta resposta ao teste de tolerância à glicose foi verificada somente quando o teste foi realizado 12 horas após o choque térmico (Figura 13B). Nos demais tempos experimentais (06 e 24 horas pós-choque), não foram constatadas diferenças entre os grupos 'choque térmico' e respectivo grupo controle (Figura 13A, 13C e 13E).

Considerando que os animais submetidos ao choque térmico apresentam maior concentração circulante de HSP70, como resposta à exposição prévia ao estresse térmico, supõe-se que a HSP70 circulante possa ter se ligado a insulina, liberada por ocasião da administração de glicose, minimizando sua ação hormonal e, assim,

causando maior hiperglicemia nestes animais. Cabe ressaltar que a glicemia de jejum era semelhante em ambos os grupos, e encontrava-se dentro dos parâmetros normais para ratos Wistar (RHODEN & RHODEN, 2006).

Foi avaliada também a resposta de animais sem restrição alimentar (alimentado) ao teste de tolerância à glicose, que foi realizado 12 horas pós-choque térmico. O resultado deste GTT assemelha-se ao observado no GTT com animais em jejum, não obstante sua distinta condição alimentar. Vale destacar que a condição glicêmica dos animais sem restrição alimentar, antes da sobrecarga de glicose (tempo 0 da curva glicêmica), não difere dos animais mantidos em jejum, não obstante a distinta condição alimentar (alimentado).

Após a obtenção dos dados relativos aos testes de tolerância à glicose, procedeu-se ao cálculo da área incremental sob a curva (IAUC), cujos resultados (Figura 14) confirmam maior hiperglicemia, no grupo choque térmico (HS) durante o GTT realizado 12 horas após o choque térmico. Resultado semelhante também é apresentado em estudo realizado por Chung et al. (2008), no qual, animais submetidos à terapia térmica apresentam um pico glicêmico e respectiva área sob a curva (AUC), maiores do que a dos respectivos 'controles'.

Avaliamos também o efeito da quercetina, bloqueador da expressão de HSP70, em animais submetidos ao teste de tolerância à glicose, realizado 12 horas após o choque térmico. Em modelos celulares, a quercetina inibe a síntese de novas moléculas de HSP70 induzida por choque térmico, inibindo a transcrição e os eventos pós-transcricionais (ELIA & SANTORO, 1994). *In vivo*, a inibição da expressão de HSP70 pela quercetina reverte quase que completamente a proteção conferida pelo tratamento com choque térmico sobre a injúria por isquemia renal aguda (JO et al., 2006). Em nosso estudo a administração de quercetina não suprimiu a resposta induzida pelo choque térmico (Figura 21), indicando que o efeito do choque térmico sobre o estado glicêmico não depende da síntese de novas moléculas de HSP70, mas, sim, da liberação a partir do conteúdo intracelular armazenado.

A análise do efeito do choque térmico sobre a insulinemia no tempo experimental 12 horas pós-choque (Figura 16) indica que, no período de 30 minutos após a

administração de glicose, a concentração de insulina circulante é maior nos animais submetidos ao choque térmico, cuja glicemia também é maior (Figura 13B). Portanto, há que se considerar a possibilidade de algum fator (ligação HSP70-insulina?) estar dificultando a ação da insulina nos animais submetidos ao choque térmico, razão pela qual apresentam maior pico glicêmico. Supõe-se que, neste caso, as células  $\beta$  pancreáticas estejam sendo estimuladas pela maior disponibilidade de glicose e liberando maior quantidade de insulina na circulação. Considerando possível a associação HSP70-insulina, a mesma pode estar causando impedimento à ação insulínica, produzindo maior hiperglicemia e mais estímulo sobre a secreção pancreática de insulina. Neste caso, teríamos uma situação desfavorável à regulação da glicemia, provocada por uma condição de estresse prévio (choque térmico). Ao final do teste de tolerância à glicose, realizado 12 h pós-choque, a insulinemia não difere entre os grupos 'controle' e 'choque térmico'. O choque térmico também não modificou a insulinemia basal quando comparamos ambos os grupos (C e HS) no tempo de 12 horas pós-choque, apesar de ter produzido efeito no tempo experimental 24 horas.

Como já mencionado, os resultados mostram que os animais submetidos ao choque térmico apresentam maior disponibilidade de glicose circulante em todos os testes de tolerância realizados 12 horas após o estresse térmico (choque térmico) (Figuras 13B, 13D, 17 e 18). Isto faz supor que alguns tecidos estejam captando menos glicose. Assim sendo, foram realizados experimentos para avaliação da captação de glicose e 2-desóxi-glicose (2-DG), radiomarcada em tecidos de animais, após terem sido submetidos a choque térmico (12 horas) A análise da captação de glicose pelos principais tecidos alvo da insulina, individualmente e expressos por grama de tecido, indica que o choque térmico causa menor captação de glicose radiomarcada em dois importantes tecidos da ação insulínica, o músculo esquelético (solear) e o tecido adiposo, sendo que, no tecido adiposo, esta menor captação é observada na presença de glicose, enquanto que, no músculo, a menor captação se dá nos grupos que não receberam glicose (Figura 24B).

O tecido adiposo e o músculo esquelético são tecidos em que a captação de glicose é dependente de insulina e do transportador de glicose GLUT4. A expressão de GLUT4 é abundante nos tecidos mencionados, porém estes transportadores são

armazenados em vesículas no citosol. A estimulação celular pela insulina promove a exocitose e a translocação das vesículas contendo GLUT4 para a membrana plasmática, e resulta em aumento de até 30 vezes na captação de glicose por essas células. Sem o estímulo da insulina, a concentração de GLUT4 na membrana destas células é muito baixa e, como os tecidos muscular e adiposo correspondem a aproximadamente 60% da massa corporal total, o respectivo controle exercido pela insulina é fundamental para a normalização da glicemia no período absorptivo ou de maior oferta de glicose circulante (PRADA & SAAD, 2011; EL BACHA, 2002). A maior captação periférica de glicose, cerca de 80%, ocorre no músculo esquelético, onde ela é utilizada ou armazenada na forma de glicogênio de modo insulino-dependente. O tecido adiposo é responsável por menor captação periférica, cerca de 2-5%, porém, apresenta importante função na manutenção da homeostasia da glicose total em razão da liberação de ácidos graxos livres (TRIPLITT, 2012).

Neste contexto, a análise do resultado obtido em relação à menor captação do 2-DG, radiomarcada nos animais submetidos ao estresse térmico, implica em considerarmos diversas possibilidades. A menor captação de glicose e a maior disponibilidade deste nutriente na circulação, causadas pelo choque térmico, podem estar sendo mediadas por hormônios do estresse como os glicocorticoides. Como já mencionado, a liberação da HSP70 parece não depender do eixo ACTH-glicocorticoides (Johnson et al., 2005) e portanto, neste caso, poderíamos supor que o efeito observado esteja sendo causado diretamente pela ação dos glicocorticóides sobre os tecidos muscular e adiposo. Os glicocorticoides são capazes de reduzir a sensibilidade à insulina por mecanismos que envolvem a redução da ligação da insulina ao seu receptor, por causar alterações nas interações proteína-proteína na cascata de sinalização insulínica e por promover redução da translocação do GLUT4 (FRANCO-COLÍN, 2006). Contudo, nossos resultados relativos aos testes de tolerância à insulina, da insulinemia e do HOMA-IR não indicam ter havido aumento da resistência insulínica nos períodos e condições em que se observou maior hiperglicemia, o que reforça a ideia de que o efeito do choque térmico esteja relacionado à indisponibilidade da insulina circulante. Todavia, entendemos ser absolutamente pertinente o desenvolvimento de estudos investigativos acerca da presença do transportador GLUT4 em tecidos alvo da insulina,

bem como a análise de proteínas chave da cascata de sinalização intracelular da insulina, para que os mecanismos responsáveis pela menor captação observada sejam melhor esclarecidos (estes estudos estão em desenvolvimento em nosso laboratório).

Ainda, há que se considerar que os glicocorticoides poderiam estar exercendo influência indireta sobre o metabolismo da glicose através de um aumento na lipólise, elevando a concentração de ácidos graxos livres (AGL) na circulação (FRANCO-COLÍN, 2006). A maior disponibilidade destes nutrientes na circulação poderia ser a causa da maior disponibilidade de glicose observada nos animais submetidos ao choque térmico, tendo em vista a competição entre estes nutrientes como substratos para a síntese de ATP nos músculos esquelético e cardíaco e nos adipócitos (HABER *et al.*, 2001). Apesar de não termos observado efeito da interação tempo e tratamento sobre a concentração de ácidos graxos livres, a análise do efeito do tratamento sobre a concentração de AGL, em cada tempo experimental individualmente, indica que, imediatamente após o choque térmico, a concentração de AGL é menor nos animais submetidos ao choque térmico (Figura 22). Além disso, a alteração (redução) sobre a concentração de AGL causada pelo estresse térmico ocorreu somente no período imediatamente após o choque térmico, em que não observamos estado glicêmico distinto em razão do choque térmico. Assim, no momento em que se verifica maior disponibilidade de glicose circulante e menor captação tecidual de glicose (12 horas após o choque térmico), a concentração de ácidos graxos entre o grupo submetido ao choque térmico e seu respectivo controle não diferem, o que minimiza a possibilidade de que a resposta hiperglicêmica tenha sido causada pela utilização preferencial de ácidos graxos em detrimento de glicose ou pela ação dos glicocorticoides, não obstante não termos realizado a mensuração da concentração destes hormônios na circulação.

Os valores relativos à captação de glicose pelos tecidos, considerando a massa que cada um representa em relação ao peso corporal total (Figura 24), mostram que nenhum tecido captou mais glicose em consequência da maior oferta circulante. Embora a glicose seja requerida por todas as células, o maior tecido consumidor é o tecido nervoso, tanto na condição de jejum como após oferta de glicose, cuja utilização representa cerca de 50% do total de glicose (TRIPLITT, 2012). Avaliando, portanto, a importância da disponibilidade permanente de glicose para o encéfalo, em especial em

situações de estresse, supunha-se que este órgão/ tecido estivesse captando mais glicose; entretanto, não se observou maior captação de glicose por este órgão.

Nossa hipótese, de que a menor captação de glicose e maior disponibilidade na circulação, 12 horas após o choque térmico, possam ter ocorrido em razão da indisponibilidade da insulina para realizar sua ação estimuladora sobre a captação de glicose, por estar ligada à HSP70 plasmática, é ainda mais reforçada pelos resultados relativos aos testes realizados com anticorpo anti-HSP70 (Figura 20). O teste de tolerância à glicose foi realizado 12 horas após choque térmico, porém, antes do teste, um grupo de animais foi tratado com anticorpo anti-HSP72/73. Os resultados mostram que o bloqueio da ação da HSP70 pelo referido anticorpo suprime totalmente o efeito do choque térmico sobre a tolerância à glicose. Os respectivos valores da área incremental sob a curva indicam que a resposta dos animais submetidos ao choque térmico tratados com anticorpo assemelha-se à resposta do grupo controle. Estes resultados reforçam o pressuposto de que a HSP70 tem implicações na regulação da glicemia, modula a oferta de glicose aos tecidos e de que tem efeitos que parecem ser independentes de estímulo de outros hormônios.

Além disso, no intuito de verificar o efeito direto da HSP70 sobre captação celular/tecidual de glicose, foram realizados experimentos *in vivo* com injeção de HSP70 (HSP70-A1) exógena. Os resultados indicam existir um efeito da HSP72 *per se* (ação essencialmente extracelular) que é diferente do efeito do choque térmico (Figuras 25 e 26). Todavia, resultados dos ensaios de incubação de músculo solear isolado demonstram que a HSP72 causa redução na captação de glicose sendo esta inibição insulino dependente (Figuras 27 e 28), além de ser dependente de algum fator presente no soro (dialisado) do próprio animal em experimentação, visto que a remoção do soro e do ADP abolem esse efeito. Constata-se que a HSP72 produz efeito inibidor sobre a captação de glicose no músculo somente na presença de insulina e com concentrações de glicose de jejum ou de hipoglicemia (5,5 mM e 2,75 mM, respectivamente). Quando a concentração de glicose é 11 mM, a HSP72 não tem efeito na presença de insulina. Neste sentido, outros ensaios *in vitro*, com células L6, estão em desenvolvimento no nosso laboratório, e devem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos nesta resposta.



Apesar das evidências de que a eHSP72 esteja causando os efeitos sobre a glicemia observados 12 h após o choque térmico, em razão da sua ligação à insulina, não se pode descartar também a possibilidade de que a HSP70 esteja agindo por meio de receptores específicos, em células musculares esqueléticas. Neste caso, ainda que a insulina esteja presente, sinalizando nos seus próprios receptores, os efeitos de ambas podem se anular e causar aumento na disponibilidade de glicose. A eHSP70 pode ligar-se a receptores altamente conservados denominados receptores do tipo TLR-2 e TLR-4, localizados na superfície de células apresentadoras de antígenos, induzindo à produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (ASEA, 2008). A ativação destes receptores aciona vias de sinalização inflamatória que incluem a ativação da JNK e IKK $\beta$ , bloqueando a ação da insulina (CHUNG *et al.*, 2008). Neste sentido, a confirmação ou não de que a ligação da insulina com HSP70 seja a causa das alterações glicêmicas e das alterações na captação celular de glicose, mencionadas ao longo deste trabalho, depende também dos resultados de experimentos em desenvolvimento, utilizando-se anticorpos para receptores de HSP70 e insulina marcada (para avaliar o *binding* da insulina a seus receptores).

Por ora, os resultados obtidos e apresentados neste trabalho demonstram que a eHSP70 plasmática é capaz de se ligar à insulina e alterar a resposta glicêmica, causando diminuição da captação de glicose pelo músculo esquelético. Estes efeitos são dependentes do tempo transcorrido desde a exposição ao choque térmico, visto terem sido observados somente 12 h após o choque térmico.

Tendo em vista estudos prévios do nosso laboratório e os resultados obtidos no estudo ora apresentado, faz-se necessário algumas considerações acerca do papel da HSP70 no ambiente intracelular e sobre a razão HSP70 extra:intracelular. Em nosso estudo, observamos que, no tempo experimental de 24 h pós-choque, os animais submetidos ao choque térmico parecem apresentar maior sensibilidade à insulina (Figura 17C). Do mesmo modo, o resultado do HOMA-IR (Figura 19) também indica que o choque térmico causa diminuição da resistência insulínica no tempo experimental de 24 horas. Assim, temos a previsão de que neste tempo (24 h após o choque), os animais possam apresentar aumento da HSP70 intracelular, o que aumentaria a sensibilidade à insulina, corroborando resultados de estudos de outros pesquisadores, relativos ao

benefício do choque térmico no controle glicêmico a longo prazo, apoiando as perspectivas de utilização de choque térmico com terapia (HOOPER & HOOPER, 2005; CHUNG, et al., 2008; GUPTA et al., 2008 ; GUPTA et al., 2009)

O aumento da concentração intracelular da HSP70, induzido por terapia de choque térmico, protege contra hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerância a glicose e resistência insulínica (HOOPER, 1999; CHUNG et al., 2008), e a redução na expressão das proteínas de choque térmico parece estar envolvida na patogênese da resistência insulínica (GUPTA *et al.*, 2009). Indivíduos diabéticos apresentam expressão de HSP70 negativamente correlacionada com os níveis de glicemia de jejum (HOOPER & HOOPER, 2005), com alta concentração de eHSP70 plasmática e baixa concentração intracelular (em diabéticos obesos) (RODRIGUES-KRAUSE *et al.*, 2012). O aumento da concentração de eHSP72 extracelular também está associado com a duração do diabetes (Nakhjavani et al.,2010).

Neste sentido, os estudos relatados e os resultados mencionados apontam também para a possibilidade de que a ação da eHSP70 circulante sobre a glicemia possa depender da razão extra:intracelular do conteúdo de HSP70, visto que o equilíbrio entre a eHSP70 e a iHSP70 está correlacionado à razão entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, que influenciam no controle glicêmico (HECK, manuscrito em preparação, 2013). Assim, análises relativas às condições intracelulares (em desenvolvimento em nosso laboratório) podem indicar a implicação desta razão (eHSP70/iHSP70) nos resultados obtidos neste trabalho.

Neste contexto, poderíamos supor que os efeitos (distintos) da HSP70 intra e extracelular sobre a glicemia apresentam uma lógica semelhante a das ações desta proteína sobre o processo inflamatório, ou seja, suas ações podem produzir tanto um estado anti-inflamatório quanto pró-inflamatório, dependendo do ambiente em que esta proteína se encontra com predominância e das demais condições do organismo. Isso nos leva a pensar na relação coordenada entre o sistema imunológico, o metabolismo e os mecanismos de defesa para situações de ameaça a vida, com a finalidade de responder às infecções e economizar energia. Sendo a HSP70 a proteína de choque térmico mais conservada filogeneticamente, é plausível conjecturar que ela faça

parte de um complexo sistema de defesa responsável por garantir a disponibilização de glicose aos tecidos e o combate às infecções.

Nesta linha, há que se considerar a pertinência de outras investigações, relacionadas à participação da AMPK nos eventos observados durante nosso estudo, pois a AMPK é uma enzima sensível ao *status* energético intracelular que participa da regulação da captação de glicose por aumentar a translocação do GLUT4 por vias distintas das ativadas pela insulina e, quando ativada, bloqueia a enzima GSK3 $\beta$ , responsável pela inibição do fator HSF1 e, conseqüentemente, pelo bloqueio da expressão de HSP70. Além disto, esta via, alternativa à da insulina para produzir captação de glicose, pode ser inibida por processos inflamatórios/infecciosos severos (sepsis), causando hiperglicemia (Andreasen *et al.*,2009).

Em suma, os resultados apresentados neste trabalho de investigação, mesmo que não concluído em todas as suas dimensões, mostra que a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) liga-se à insulina na circulação sanguínea, e pode modular a disponibilidade de glicose circulante. Além disso, esses achados apontam para novas estratégias terapêuticas no combate à hipoglicemia de pacientes diabéticos em tratamento com insulina. Nesta mesma linha de raciocínio, pode-se imaginar que nas obesidades e no diabetes tipo II, as enormes quantidades de HSP70 liberadas na circulação, por conta do estresse inflamatório generalizado nestas situações, possam ser suficientes para neutralizar boa parte da insulina circulante, obrigando o pâncreas a secretar mais e mais insulina. Conseqüentemente, estando esta proposição correta, a HSP70 extracelular, por conta de sua ligação à insulina, pode ser um agravante adicional à resistência ao hormônio nestes indivíduos. Sendo assim, não se pode descartar a possibilidade de que o tratamento com anticorpos anti-HSP70 ou aptâmeros de DNA específicos para a mesma finalidade possa servir de adjuvante no acompanhamento de pacientes portadores de diabetes.

# CONCLUSÃO

---

Nossos resultados permitem concluir que:

- A eHSP70 liga-se à insulina circulante o que implica potencialmente na modulação da glicose disponível na circulação.

- O choque térmico agudo e a hipoglicemia causam a liberação de HSP70 para a circulação sanguínea, cuja presença pode ser detectada ao longo de um período experimental de até 24 horas após o choque térmico.

- O choque térmico modifica a resposta glicêmica à sobrecarga de glicose, implicando em uma maior disponibilidade de glicose na circulação, e diminui a captação muscular de glicose. Este efeito não se correlaciona com a disponibilidade de ácidos graxos circulantes.

- O efeito do choque térmico sobre a resposta glicêmica acontece somente se houver disponibilidade de HSP70 circulante e parece não depender da síntese *de novo* desta proteína.

- O efeito da HSP70 circulante sobre a resistência insulínica é diferente nos distintos tempos de recuperação pós-choque térmico.

De forma sistematizada, nossos resultados indicam que a eHSP70 plasmática é capaz de se ligar à insulina, alterar a tolerância à glicose e diminuir a captação de glicose no músculo esquelético. Portanto, concluímos que a eHSP70 deva exercer papel fisiológico de modular a disponibilidade de glicose circulante, em situações de estresse, particularmente na hipoglicemia.

## PERSPECTIVAS

---

- ✓ Averiguar o mecanismo molecular pelo qual essa ligação ocorre e é desfeita.
- ✓ Investigar as ações da HSP70 sobre receptores específicos localizados em tecidos alvo da insulina.
- ✓ Ampliar as investigações relativas aos transportadores de glicose (com atenção especial à participação do Glut4) e aos eventos intracelulares ocorridos com os animais abordados neste estudo.
- ✓ Avaliar o impacto (e consequências para terapias do diabetes tipo II) da superprodução de HSP72 circulante como situação de sobrecarga ao pâncreas que necessita secretar mais insulina para contrapor a resistência imposta pela ligação do hormônio às HSP70.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ANDERSEN, S.K., J. GJEDSTED, *ET AL.* The roles of insulin and hyperglycemia in sepsis pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, v.75, march 2004.

ANDREASEN, A.S., T. PEDERSEN-SKOVSGAARD, *ET AL.* The effect of glutamine infusion on the inflammatory response and HSP70 during human experimental endotoxaemia. *Crit Care Med*, v.13, n.1,p.1-8, 27 jan.2009.

ASEA, A. A. A., DE MAIO, A. A história por dentro: funções anti-inflamatória do HSF1 e das proteínas de choque térmico. In: Alexzander A. A. Asea and Antonio De Maio, *Protein Reviews, Volume 1: Heat Shock Proteins: Potent mediators of inflammation and Immunity - Edited*, v.1, cap.7, Ed. Springer. 2007.

ASEA, A. Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol*, n.183, p.111-127. 2008.

ATALAY, M., N. OKSALA, *ET AL.* Heat shock proteins in diabetes and wound healing. *Curr Protein Pept Sci*, v.10, n.1, Feb, p.85-95. 2009.

BATHAIE, S. Z., A. JAFARNEJAD, *ET AL.* The effect of hot-tub therapy on serum Hsp70 level and its benefit on diabetic rats: a preliminary report. *Int J Hyperthermia*, v.26, n.6, p.577-585. 2010.

BECKER T, HARTL FU, WIELAND F. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol*. 2002 Sep 30;158(7):1277-85.

BERENDSEN H.J.C., J.P.M. POSTMA, A. DINOLA, and J.R. HAAK, Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684-3690.

BERENDSEN H.J.C., J.R. Grigera, and T.P. Straatsma, The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 6269-6271.

BROWN, C. R., R.L. MARTIN, *ET AL.* The constitutive and stress inducible forms of hsp 70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion. *J Cell Biol*, v.120, n.5, p.1101-1112. 1993.

BURKART, V., R. K. SIEGENTHALER, *ET AL.* High affinity binding of hydrophobic and autoantigenic regions of proinsulin to the 70 kDa chaperone DnaK. *BMC Biochem*, v.8, n. 11. 2010.

CALDERWOOD, S. K., S. S. MAMBULA, *ET AL.* Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann N Y Acad Sci*, v.1113, p.28-39, out. 2007a.

CALDERWOOD, S.K., S. XIAO, *ET AL.* The inside Story: Anti-Inflammatory roles of HSF-1 and heat shock proteins. In: Asea, A.A.A and De Maio A., V. 1: Heat Shock Proteins: Potent mediators of inflammation and Immunity, Cap. 7, Ed. Springer, 2007.

CHUNG, J. *ET AL.* HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance, *PNAS*, v. 105, n.5, p1739-1744, February, 2008.

COMEAU SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*. 2004 Jul 1;

COMEAU SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*. 2004 Jan 1;

COMEAU, S. R., D. W. GATCHELL, *ET AL.* ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*. v.1. 2004.

CURI, R, P. I. HOMEM DE BITTENCOURT. Metabolismo do Ácido Araquidônico In: Da Silva , F. P. & Velasco, I.T. Sepse, Cap. 20, p.214-242, Ed. Manole, 1.ed., 2007

DARDEN T., D. York, and L. Pedersen, Particle Mesh Ewald – an N.log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 10089-10092.

DE MAIO, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones*, v.16, n.3, p.235-249, mai. 2011.

DE MAIO, A., SANTORO, M. G. *ET AL.* Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress Chaperones*, v.17, n.2, p.139-143, mar. 2012.

DUCKWORTH WC, BENNETT RG, HAMEL FG (1998). Insulin degradation: progress and potential. *Endocr. Rev.* 19 (5): 608–24. doi:10.1210/er.19.5.608.

EL BACHA, T. Insulina, *in*: Hormônios e metabolismo Integração e correlações clínicas, Editores: Andrea T. Da Poian e Paulo César de Carvalho-Alves, Cap. 2, São Paulo, Editora Atheneu, 2002.

ELIA G, SANTORO MG. Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells. *Biochem J.* 1994 May 15;300 ( Pt 1):201-9.

ELLIS, S., M. KILLENDER, *ET AL.* Immunohistochemistry and Immunogold Electron Microscopy Heat-induced Alterations in the Localization of HSP72 and HSP73 as Measured by Indirect. *J Histochem Cytochem*, v. 48, n.3, p.321-332. 2000.

FEBBRAIO, M. A., J. L. MESA, *ET AL.* Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans. *Cell Stress Chaperones*, v.9, n.4, p.390-396. 2004.

FEBBRAIO, M. A., A. STEENBERG, *ET AL.* Reduced muscle glycogen availability is associated with elevated HSP72 in contracting human skeletal muscle. *Journal of Physiology*, v.538, Pt. 3, p.911-917. 2002a.

FEBBRAIO, M. A., P. OTT, *ET AL.* Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. *Journal of Physiology*, v.544, Pt. 3, p.957-962. 2002b.

FRANCO-COLÍN, M.; IVÁN VILLANUEVA, M. P. AND RADU, R. The effects of sympathectomy and dexamethasone in rats ingesting sucrose, *Int. J. Biol. Sci*, 2 17, . 2006.

FLESHNER, M., J. D. JOHNSON, *ET AL.* Extracellular HSP72: a double-edged sword for host defense. In: Alexander A. A. Asea and Antonio De Maio, Protein Reviews, Volume 1: Heat Shock Proteins: Potent mediators of inflammation and Immunity - Edited, v.1, cap.7, Ed. Springer. 2007.

GELAIN, D. P., *ET AL.* Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. *Shock*, v.35, n.5, p.466-470, 2011.



GOLDFARB, S. B. Differential effects of Hsc70 and Hsp70 on the intracellular trafficking and functional expression of epithelial sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.103, n.15, p.5817-5822. 2005.

GRUNWALD, M.S. (2013) A oxidação da proteína de choque térmico HSP70 e seus efeitos sobre a modulação da ativação de macrófagos da Linhagem Raw 264.7. A relação com a sepse e a possível sinalização pela ligação ao receptor dos produtos finais da glicação avançada - RAGE. Dissertação de Mestrado. *Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Fevereiro, 2013.

GUPTE, A. A., G. L. BOMHOFF, *ET AL.* Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Diabetes*, v.58, n.3, Mar, p.567-578. 2008.

GUPTE, A. A., G. L. BOMHOFF, *ET AL.* Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Diabetes*, v.58, n.3, p.567-578, mar. 2009.

HABER, E.P, R. CURI, *ET AL.* Secreção de Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 45, n.3, jun. 2001.

HAGEMAN, J., M. A. VAN WAARDE, *ET AL.* The diverse members of the mammalian HSP70 machine show distinct chaperone-like activities. *Biochem J.* v.435, n.1, p.127-142. 2011.

HECK, T. G. Razão entre o conteúdo extracelular e intracelular de hsp70 como um sinal de alerta imunológico e marcador de intensidade de exercício. Tese de Doutorado. *Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

HENDERSON, B. Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. *Cell Biochem Funct*, v.28, n.1, Jan, p.1-14. 2010.

HESS B. H. Bekker, H.J.C. Berendsen, and J.G.E.M. Fraaije, LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* 18 (1997) 1463-1472.

HESS B., C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* 4 (2008), 435-447.

HIGHTOWER, L. E., P. T. GUIDON JR. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J Cell Physiol*, v.138, n.1, p.257–266. 1989.

HOMEM DE BITTENCOURT, P. I., JR., D. J. LAGRANHA, *ET AL.* LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, v.193, n.2, Aug, p.245-258. 2007.

HOOPER, P. L. E J. J. HOOPER. Loss of defense against stress: diabetes and heat shock proteins. *Diabetes Technol Ther*, v.7, n.1, p.204-208, fev. 2005.

HOOPER, P. L. E P. L. HOOPER. Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones*, v.14, n.2, Mar, p.113-115. 2009.

HOOPER, P. L. Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*, v.341, n.12, Sep 16, p.924-925. 1999.

HUNTER-LAVIN, C., E. L. DAVIES, *ET AL.* Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v.324, n.2, p.511-517, nov. 2004.

IRELAND, H. E., F. LEONI, *ET AL.* Measuring the secretion of heat shock proteins from cells. *Methods*, v.43, n.3, p.176-183, nov. 2007.

JAFFE, S., G. DOULAVERIS, *ET AL.* Induction of the 72 kDa heat shock protein by glucose ingestion in black pregnant women. *Cell Stress Chaperones*, v.18, n. 4, p.527-530. 2013.

JESSEN N. AND GOODYEAR, L.J. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle, *J Appl Physiol*, Vol 99, July, 2005.

JO SK, KO GJ, BOO CS, CHO WY, KIM HK. Heat preconditioning attenuates renal injury in ischemic ARF in rats: role of heat-shock protein 70 on NF-kappaB-mediated inflammation and on tubular cell injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Nov;17(11):3082-92.

JOHNSON, J. D. & M. FLESHNER. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol*, v.79, n.3, Mar, p.425-434. 2006.

JOHNSON, J. D., J. CAMPISI, *ET AL.* Adrenergic receptors mediate stress-induced elevations in extracellular Hsp72. *J Appl Physiol*, v.99, n.1, p.1789–1795, 2005.

KNOWLTON, A. A. NF- $\kappa$ B, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation cardiovascular. *Cardiovascular Research*, v.69, n.1, p.7-8. 2006.

KOZAKOV D, Brenke R, Comeau SR, Vajda S. PIPER: An FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins*. 2006 Aug 24;

KOZAKOV, D., D. R. HALL, *ET AL.* Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking: Cluspro, PIPER, SDU, and stability analysis in CAPRI rounds 13–19. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. V.78, p.3124–3130. 2010.

KOZAKOV, D., Hall, D. R., Beglov, D., Brenke, R., Comeau, S. R., Shen, Y., Li, K., Zheng, J., Vakili, P., Paschalidis, I. C. and Vajda, S. (2010), Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking: Cluspro, PIPER, SDU, and stability analysis in CAPRI rounds 13–19. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78: 3124–3130;

KOZAKOV, D., R. BRENKE, *ET AL.* An FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins*. V.24. 2006.

KURUCZ, I., A. MORVA, *ET AL.* Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes*, v.51, n.4, Apr, p.1102-1109. 2002.

LAGER, I. The insulin-antagonistic effect of the counterregulatory hormones, 1991;735:41-7.

LANDRY, S. J. Protein Disassembly by Hsp40-Hsp70. In: *Stuart K. Calderwood, Protein Reviews, Volume 7: Cell Stress Proteins - Edited*, v.1, cap.5, Ed. Springer. 2007.

LASKOWSKI R.A., M.W. Macarthur, D.S. Moss, and J.M. Thornton, Procheck - A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26 (1993) 283-291.

LASKOWSKI R.A., PDBsum new things. *Nucleic Acids Res.*37 (2009)D355-D359.

LEE, H. B., M. D. BLAUFOX. Blood volume in the rat. *J. Nucl Med*, v.25, n.1, p.72-76. 1985.

LI, G., R. W. CURRIE, *ET AL*. Insulin potentiates expression of myocardial heat shock protein 70. *Eur J Cardiothorac Surg*, v.26, n.2, p.281-288. 2004.

LIEBSCHER M, Roujeinikova A. Allosteric coupling between the lid and interdomain linker in DnaK revealed by inhibitor binding studies. *J Bacteriol*. 2009 Mar;191(5):1456-62. Epub 2008 Dec 19.

LINDQUIST. S. The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.* v.55, p.1151-1191. 1986.

MATTHEWS DR, HOSKER JP, RUDENSKI AS, NAYLOR BA, TREACHER DF, TURNER RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412–419, 1985.

MATHONNET, A. e CARIOU. Glycemic Control in Sepsis. *Adv Sepsis*, v.6, n.1, p.16–8. 2007.

MEYER, T. N. Resposta celular ao estresse. *Rev Ass Med Brasil*, v.45, n.2, p.181-188. 1999.

MINGUETE, V. C., T. G. HECK, *ET AL*. Hipoglicemia de curto prazo induzida pela administração de insulina regular modifica marcadores inflamatórios sistêmicos e a expressão de HSP72 e HSP73 no fígado de ratos. In: XXV Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia - SP. 2010.

MORAES, J. C. M., M. M. ROGERO, *ET AL*. Sistema nervoso central e inflamação: descontrole nos mecanismos de fome e saciedade. In: Cintra, D. E., Ropelle, E. R., Pauli, J. R. *Obesidade e diabetes – fisiopatologia e sinalização celular*. Ed. Sarvier, 2011.

MORIMOTO, R., A. TISSIERES, *ET AL*. *Stress Proteins in Biology and Medicine*. New York: Cold Spring Harbor 1990. 450 p. (Monograph Series)

MULTHOFF G., HIGHTOWER L. E. Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies. *Cell Stress Chaperones*. v.16, n. 1, p.251-255. 2011.

NAKAI, A., M. TANABE, *ET AL.* HSF4, a new member of human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.*, v.17, n.1, p.469–481. 1997.

NAKHJAVANI, M., A. MORTEZA, *ET AL.* Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes. *Cell Stress Chaperones*, v.15, n.6, p.959-964, nov. 2010.

OOSTENBRINK C, Villa A, Mark AE, van Gunsteren WF. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J Comput Chem.* 25 (2004) 1656-76.

OROSZ, A., I. J. BENJAMIN. Genetic models of HSF Function. In: *Stuart K. Calderwood, Protein Reviews, Volume 7: Cell Stress Proteins - Edited*, v.1, cap.5, Ed. Springer. 2007.

PAULI, J. R. Obesidade e diabetes: bases moleculares da etiopatogenia. In: Cintra, D. E., Ropelle, E. R., Pauli, J. R. Obesidade e diabetes – fisiopatologia e sinalização celular. *Ed. Sarvier*, 2011.

PETERSEN, K. F., G. I. SHULMAN, *ET AL.* Etiology of insulin resistance. *Am J Med*, v.119, n.5, p.10-16. 2006.

PETTERSEN EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004 Oct; 25(13):1605-12.

PETTERSEN, E. F., T. D. GODDARD, *ET AL.* UCSF - Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* v.25, n.13, p.1605-1612. 2004.

PIVA, R., G. BELARDO, *ET AL.* NF-kappaB: a stress-regulated switch for cell survival. *Antioxid Redox Signal*, v.8, n.3-4, p.478-486. 2006.

POCKLEY, A. G., J. SHEPHERD, *ET AL.* Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest*, v.27, n.1, p.367–377. 1998.

POL-FACHIN L., H. Verli, Structural glycobiology of the major allergen of *Artemisia vulgaris* pollen, *Art v 1: O-glycosylation influence on the protein dynamics and allergenicity. Glycobiology* 22 (2012) 817-825.

PRADA, P. O., SAAD, M.J.A., Bases moleculares da sinalização insulínica. In: Cintra, D. E., Ropelle, E. R., Pauli, J. R. *Obesidade e diabetes – fisiopatologia e sinalização celular. Ed. Sarvier, 2011.*

RAN, R., A. LU, *ET AL.* Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. *Genes Dev*, v.18, n.12, p.1466-1481, jun. 2004.

RHODEN, C. R., E. L. RHODEN. *Princípios e Técnicas Em Experimentação Animal. Ed. UFRGS, p.567. 2006.*

RODRIGUES-KRAUSE, J., M. KRAUSE, *ET AL.* Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? *Cell Stress Chaperones*, v.17, n.3, jan. 2012.

SÁNCHEZ R., and A. Šali, Comparative protein structure modeling: Introduction and practical examples with MODELLER. *Methods Mol. Biol.* 143 (2000) 97-129.

SANTORO, M. G. Heat Shock Factors and the Control of the Stress Response. *Biochemical Pharmacology*, v. 59, p. 55–63, 2000.

SCHUERMAN JP, Jiang J, Cuellar J, Llorca O, Wang L, Gimenez LE, Jin S, Taylor AB, Demeler B, Morano KA, Hart PJ, Valpuesta JM, Lafer EM, Sousa R. Structure of the Hsp110:Hsc70 nucleotide exchange machine. *Mol Cell.* 2008 Jul 25;31(2):232-43. Epub 2008 Jun 12.

TRIPLITT, C. L. Examining the mechanisms of glucose regulation, *Am. J. Manag. Care.*, 18:S4-S10, Suppl n 1, January, 2012.

USA-FAO – Food and Agriculture Organization. *Carbohydrates is Human Nutrition.* 1997. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/w8079e/w8079e00.htm#Contents>.

VERLI H., and J.A. Guimarães, Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution. *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 281–290.

VOLPATO, G. L. Pérolas da redação científica. São Paulo, Cultura Acadêmica, 2010. 489 p.

WALLACE, T. M., J. C. LEVY, *ET AL.* Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*, v.27, n.6, p.1487-1495. 2004.

WALSH, R. C., I. KOUKOULAS, *ET AL.* Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell Stress Chaperones*, v.6, n.4, p.386–393. 2001.

WHITESELL, L., S. LINDQUIST. Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert Opin. Ther. Targets*. v.13, n.4, p. 469-472. 2009.

WHITTINGHAM JL, Edwards DJ, Antson AA, Clarkson JM, Dodson GG. Interactions of phenol and m-cresol in the insulin hexamer, and their effect on the association properties of B28pro-->Asp insulin analogues. *Biochemistry*. 1998 Aug 18;37(33):11516-23.

WILLIAMS, J. H. H., C. HUNTER-LAVIN. Funções das proteínas de choque térmico extracelular: um novo sensor de perigo. In: Alexzander A.A.Asea and Antonio De Maio, *PROTEIN REVIEWS - Heat Shock Proteins: Potent mediators of inflammation and Immunity*. Ed. Springer 2007.

YAMAMURA, K. Transformation using  $(x + 0.5)$  to stabilize the variance of populations. *Journal Researches on population ecology. Publisher Springer Japan*, v. 42, n.3, p. 229 – 234, 1999.

# MATERIAL COMPLEMENTAR

---

## DOCUMENTO COMPROBATÓRIO DA SUBMISSÃO DO ARTIGO:

Página 1 de 1

**Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.**

---

**De:** <nl10003@cam.ac.uk>  
**Para:** <pauloivo@ufrgs.br>  
**Enviada em:** Wednesday, November 13, 2013 9:18 PM  
**Assunto:** Cell Biochemistry & Function - Manuscript number CBF-13-0251  
13-Nov-2013

Dear Prof. Homem de Bittencourt Jr.,

Your manuscript entitled "Short-term but not long-term hypoglycaemia enhances plasma levels and hepatic expression of HSP72 in insulin-treated rats: an effect associated with increased IL-6 levels but not with IL-10 or TNF $\alpha$ " has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Cell Biochemistry & Function.

Your manuscript number is CBF-13-0251. Please mention this number in all future correspondence regarding this submission.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging into <http://mc.manuscriptcentral.com/cbf>. If you have difficulty using this site, please click the 'Get Help Now' link at the top right corner of the site.

Thank you for submitting your manuscript to Cell Biochemistry & Function.

Sincerely,

Cell Biochemistry & Function Editorial Office

11/13/2013





**Short-term but not long-term hypoglycaemia enhances plasma levels and hepatic expression of HSP72 in insulin-treated rats: an effect associated with increased IL-6 levels but not with IL-10 or TNF $\alpha$**

Journal:	<i>Cell Biochemistry &amp; Function</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ludwig, Mira; Regional University of Northwestern Rio Grande do Sul State, Life Sciences Minquetti Câmara, Vânia; State University of Maringá, Pharmacology and Therapeutics Heck, Thiao; Regional University of Northwestern Rio Grande do Sul State, Life Sciences Scornazzon, Sofia; Federal University of Rio Grande do Sul, Physiology Nunes, Patrícia; Federal University of Rio Grande do Sul, Physiology Bazotte, Roberto; State University of Maringá, Pharmacology and Therapeutics Homem de Bittencourt Jr., Paulo Ivo; Federal University of Rio Grande do Sul, Physiology
Keywords:	Hypoglycaemia, Heat shock proteins, HSP72, interleukin-6, interleukin-10, tumour necrosis factor-alpha, insulin
Abstract:	The inducible expression of HSP70 is associated with homeostatically stressful situations, not only heat. Stressful situations that involve sympathetic nervous system (SNS) activation, including $\alpha$ 1-adrenergic agonists and physical exercise, are capable of inducing HSP70 expression and release of the major HSP70 inducible form, HSP72. However, whether hypoglycaemia is capable of influencing HSP70 status under a stressful situation such as insulin-induced hypoglycaemia (IIH), which also involves SNS activation, is unsettled. Hence, we decided to investigate whether the predominant signal for HSP70 expression and delivery into the blood comes from either low glucose, high insulin or both during short-term IIH and long-term IIH. Our data showed that low glucose level (up to $1.56 \pm 0.14$ mM), but not insulin, is the triggering factor responsible for a dramatic rise in HSP72 plasma concentrations (from $0.15 \pm 0.01$ in fed state to $0.77 \pm 0.13$ ng/mL during hypoglycaemic episodes). This was observed in parallel with up to 7-fold increases in IL-6 but not IL 10 or TNF $\alpha$ at STIIH. Together, the observations suggest that HSP72 is released under hypoglycaemic conditions as a part of the homeostatic stress response (possibly via catecholamine-induced exosome-dependent secretion), whereas at long term, both hypoglycaemia and insulin may influence

<http://mc.manuscriptcentral.com/cbf>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

	HSP72 expression in the liver, but not in kidneys. Whether secreted eHSP72 is either purely a danger signal to all the tissues of the body for the enhancement of immune and metabolic surveillance state or actively participates in glycaemic control under stressful situations is now under investigation in our laboratories.

SCHOLARONE™  
Manuscripts

For Peer Review

1  
2  
3  
4 Short-term but not long-term hypoglycaemia enhances plasma levels  
5 and hepatic expression of HSP72 in insulin-treated rats: an effect  
6 associated with increased IL-6 levels but not with IL-10 or TNF $\alpha$   
7  
8  
9  
10

11  
12  
13 Mirna Stela Ludwig<sup>1†</sup>, Vânia Cibele Minguetti-Câmara<sup>2†</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>3†</sup>, Sofia Pizzato  
14 Scomazzon<sup>1</sup>, Patricia Renck Nunes<sup>1</sup>, Roberto Barbosa Bazotte<sup>2\*</sup>, Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.<sup>1,4\*</sup>  
15  
16  
17

18  
19 <sup>1</sup>Department of Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

20 <sup>2</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

21 <sup>3</sup>Department of Life Sciences, Regional University of Northwestern Rio Grande do Sul State, Ijuí, RS

22 <sup>4</sup>National Institute of Hormones and Women's Health (INCT), Porto Alegre, RS, Brazil  
23  
24  
25

26  
27 <sup>†</sup> These authors equally contributed to the present work.  
28  
29  
30  
31

32 <sup>\*</sup>Corresponding author: Laboratory of Cellular Physiology, Department of Physiology, Institute of  
33 Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, ICBS,  
34 2º andar, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55(51)33083151; fax: +55(51)33084555; e-  
35 mail: [pauloivo@ufrgs.br](mailto:pauloivo@ufrgs.br)  
36  
37  
38  
39  
40  
41

42 **Running title:** Hypoglycaemia enhances HSP72 and IL-6  
43  
44

45  
46 **Keywords:** Hypoglycaemia, Heat shock proteins, HSP72, interleukin-6, interleukin-10, tumour necrosis  
47 factor- $\alpha$ , insulin.  
48  
49

50  
51 **Abbreviations:** HSP70, the 70 kDa family of heat shock proteins; IIH, insulin-induced hypoglycaemia,  
52 IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; TNF $\alpha$ , tumour necrosis factor alpha; STIIH, short-term IIH;  
53 LTIH, long-term IIH; SNS, sympathetic nervous system.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

<http://mc.manuscriptcentral.com/cbf>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60**ABSTRACT**

The inducible expression of the 70 kDa family of heat shock proteins (HSP70) is associated with homeostatically stressful situations, not only heat. Stressful situations that involve sympathetic nervous system (SNS) activation, including  $\alpha_1$ -adrenergic agonists and physical exercise, are capable of inducing HSP70 expression and release of the major HSP70 inducible form, HSP72 (encoded by *HSPA1A* gene). However, whether hypoglycaemia is capable of influencing HSP70 status under a stressful situation such as insulin-induced hypoglycaemia (IIH), which also involves SNS activation, is unsettled. Hence, we decided to investigate whether the predominant signal for HSP70 expression and delivery into the blood comes from either low glucose, high insulin or both during short-term IIH (STIIH) and long-term IIH (LTIIH). Our data showed that low glucose level (up to  $1.56 \pm 0.14$  mM), but not insulin, is the triggering factor responsible for a dramatic rise in HSP72 plasma concentrations (from  $0.15 \pm 0.01$  in fed state to  $0.77 \pm 0.13$  ng/mL during hypoglycaemic episodes). This was observed in parallel with up to 7-fold increases in interleukin-6 (IL-6) but not IL-10 or tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) at STIIH. Together, the observations suggest that HSP72 is released under hypoglycaemic conditions as a part of the homeostatic stress response (possibly via catecholamine-induced exosome-dependent secretion), whereas at long term, both hypoglycaemia and insulin may influence HSP72 expression in the liver, but not in kidneys. Whether secreted eHSP72 is either purely a danger signal to all the tissues of the body for the enhancement of immune and metabolic surveillance state or actively participates in glycaemic control under stressful situations is now under investigation in our laboratories.

## INTRODUCTION

The inducible expression of the 70 kDa family of heat shock proteins (HSP70) is amazingly conserved in nature from bacteria to humans, evolving throughout the history of cellular life in Earth.<sup>3,29</sup> Although they were named after the serendipitous discovery (please, see Ritossa's reflections in reference<sup>35</sup>) in heat-shocked *Drosophila busckii* cells,<sup>34</sup> by Prof. Ferruccio Ritossa, HSP70 expression is associated with homeostatically stressful situations, not only heat. In order to cope on chaperone and cytoprotective intracellular functions, at least 13 genes so far identified in humans are responsible for HSP70 family coding.<sup>20,24</sup>

Indeed, many homeostatic-threatening situations are able to induce the production of HSP70 molecules which may act both intracellularly and being exported to the extracellular milieu, where HSP70 proteins apparently works as danger signals to elevate the state of surveillance of all the cells around the body.<sup>11,21</sup> Hence, HSP70 biology resembles, in much, the way sympathetic nervous system (SNS) deal with stressful situations and, in fact, it has long been demonstrated that  $\alpha_1$ -adrenergic agonists are capable of inducing HSP70 expression in parallel with proto-oncogenes,<sup>9</sup> whereas norepinephrine enhances the expression and release of the major HSP70 inducible form, HSP72 (encoded by *HSPA1A* gene), by human neutrophils,<sup>18</sup> and activation of HSP70 gene promoter in other species via  $\alpha$ -adrenergic stimulation.<sup>30</sup> Notwithstanding,  $\alpha_1$ -adrenergic receptors mediate rise in plasma HSP72 in rats submitted to tail electric shock,<sup>23</sup> while physical exercise, one of the most powerful SNS stimulants, besides enhancing HSP72 expression in skeletal muscle (please, see reference<sup>32</sup> for review) also elevates serum HSP72 levels,<sup>43</sup> in a process which is dependent on hepatosplanchnic viscera.<sup>13</sup>

Interestingly, the administration of glucose to humans abrogates exercise-induced increase in circulating HSP72.<sup>17</sup> This reminds us again to SNS participation in HSP70 metabolism, since hypoglycaemia is an important physiological stimulus for sympathetic activation, which is reversed by the normalization of glycaemic levels. Moreover, Bergstedt and colleagues<sup>2</sup> have shown, *in vivo*, that severe insulin-induced hypoglycaemia (IIH) besides of inducing the release of epinephrine, norepinephrine, glucagon, cortisol and GH,<sup>41</sup> triggers a dramatic stress response in rat neurons in the recovery phase, including the expression of HSP72 in surviving neurons, while insulin by itself is able to trigger HSP72 gene expression in human hepatocytes.<sup>42</sup>

The above findings led us to investigate whether the predominant signal for HSP70 expression and delivery into the blood comes from either low glucose, high insulin or both in two different models of IIH. Also, we studied the effects of such maneuvers on the expression of HSP70 in the gluconeogenic tissues liver and kidney as well as its possible correlation with cytokine production, inasmuch as HSP70, interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) are intricately correlated with both hypoglycaemia and insulin secretion and action.<sup>28, 12,6</sup>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

All the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) unless if stated otherwise. Long-lasting Detemir insulin (Levemir®) as well as regular insulin (Novolin® R) were obtained from Novo Nordisk (Montes Claros, Brazil).

### Animals and treatments

Adult male Wistar rats, weighing 180–220 g, were used in this study. The rats were maintained under constant temperature ( $23 \pm 1$  °C) with automatically controlled photoperiod (12 h light/12 h dark; lights on at 7:00 a.m.) and 60% relative humidity. A standard commercial laboratory diet (Nuvilab®, Curitiba, Brazil) was given *ad libitum* before the experimental procedures. Before and during the observational periods of insulin treatments, the animals were maintained fasted having free access to water. All the procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Rio Grande do Sul, according to the guidelines of the Brazilian Council on Animal Experimentation Control (protocol number: CEUA/19858).

Short-term IH (STIH) was attained with 6 h fasted rats which received i.p. regular insulin (1 IU/kg), while long-term IH (LTIH) was induced in 15 h fasted rats with i.p. Detemir insulin (1 IU/kg). The 1 IU/kg dose, route of administration and duration of IH (STIH or LTIH) studies were based in previous works.<sup>1,36</sup> Moreover, the kinetic profile of glycaemia during animal manipulations was assessed by employing the real time continuous glucose monitoring system (RT-CGMS) technique by using Medtronic Guardian® Real-Time CGMS equipment (Medtronic® MiniMed (São Paulo, SP, Brazil) as previously described<sup>7</sup>. Insulinaemia was measured as described in the following section. Thus, by using these experimental approaches, STIH rats usually show insulin levels that peak at 15 min after hormone injection and return to basal levels between 60-90 min, while glycaemic levels sharply fall up to 30 min, maintaining a plateau up to 120 min, after what glucose levels return to basal values at time 240 min (results from pilot experiments). On the other hand, LTIH rats are exposed to insulin concentrations that peak at 15 min but remain in a plateau for up to 12 h, while glucose concentrations slowly fall up to time 240 min when basal levels are attained at approx 600 min, despite the fact that insulinaemia is still high (pilot experiments). Therefore, it is possible to dissociate low-glucose from insulin effects by comparing STIH results (short hypoglycaemia in the absence of circulating insulin after 60-90 min) with those from LTIH ones (long-lasting hypoglycaemia in the presence of circulating insulin for the duration of the observational period). The lowest glycaemic values were achieved by 30-60 min with both treatments while total hypoglycaemic periods were 10 h for STIH group (6 h fast + 4 h after regular insulin treatment) and 25 h of LTIH group (15 h fast + 10 h after Detemir insulin).

### Blood and tissue sampling

After the indicated times, animals were killed by decapitation without anesthesia for tissue excision and blood collection. This method was chosen because it is extremely rapid and does not

1  
2  
3 appreciably interfere in glucose metabolism. The death of the animals under anesthesia, while desirable,  
4 is not compatible with the experimental outcomes because the vast majority of anesthetics commonly  
5 used with experimental animals lead to an intense hyperglycaemia in rodents.<sup>3,37</sup> Furthermore, these  
6 anesthetics interfere with the function of cells involved in the systemic production of HSP72, such as  
7 monocytes,<sup>8</sup> whereas HSP72 plasma levels may be completely suppressed by high glucose levels.<sup>17</sup>  
8  
9

10  
11 Blood was then immediately collected in heparinized (30 IU/mL final volume) tubes (for  
12 glucose, insulin and cytokine measurements) or in disodium EDTA (2 mg/mL final volume)-treated  
13 tubes (for HSP72 assays). After separation, plasma samples were treated as described below and frozen  
14 at -86 °C until use.  
15

16  
17 Plasma samples destined to HSP72 measurements (EKS-715 high-sensitivity HSPA1A-specific  
18 ELISA kit, Enzo Life Sciences) were also treated with the following protease inhibitor cocktail:  
19 leupeptin (2 µg/mL = 4.2 µM), aprotinin (2 µg/mL = 0.31 µM), TLCK (tosyl-L-lysine chloromethyl  
20 ketone hydrochloride, 0.74 µg/mL = 20 µM) and PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride, 17.42 µg/mL  
21 = 100 µM). HSP72 limit of detection under the manufacturer's conditions was 90 pg/mL (1.25 pM).  
22  
23

24  
25 Heparinized samples utilized in insulin measurements (Cat. #589501 SPI-Bio rat insulin  
26 competitive EIA, Cayman Chemical) were also treated with 4.52 µg/mL disodium EDTA and  
27 1.3 µg/mL *o*-phenanthroline (final concentrations in the plasma) prior to immunoenzymatic assays, in  
28 order to prevent any undesirable hemolysis-dependent insulin degradation, even if no visible sign of  
29 hemolysis were detected, as recommended by the kit's manufacturer. Insulin limit of detection was  
30 0.05 ng/mL (1.2 µIU/mL).  
31  
32

33  
34 Plasma glucose concentrations were assessed by using a glucose oxidase-based commercial  
35 colorimetric kit (Liquiform, Labtest Diagnóstica, Vista Alegre, Brazil) while plasma interleukin-6  
36 (IL-6), IL-10 and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) were evaluated using commercially streptavidin-  
37 phycoerythrin-based multiplex bead immunoassay kit Milliplex® in 96 well plates and Luminex 200  
38 System and accompanying xPONENT® software (Millipore, USA).  
39  
40

41  
42 Soon after blood harvesting, the liver and kidneys were surgically excised, weighed and  
43 immediately freeze-clamped in liquid nitrogen for protein analyses. Tissue samples were stored frozen  
44 at -86 °C for subsequent analysis.  
45  
46

#### 47 *Protein Separation and Detection*

48  
49 In order to examine protein expression, whole liver (7-8 g) and kidney (1.4-2.0 g) slices were  
50 homogenized and processed for sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis  
51 (SDS-PAGE) and immunoblot analyses as adapted from elsewhere.<sup>26,27</sup> Briefly, tissues were  
52 homogenized (still frozen) in 5 volumes of 0.1% (w/v) SDS buffer containing protease and phosphatase  
53 inhibitor cocktail (Sigma) consisting of leupeptin (4.2 µM), aprotinin (0.31 µM), TLCK (20 µM), PMSF  
54 (100 µM), sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 1 mM), sodium molybdate (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 1 mM) and  $\beta$ -  
55 glycerophosphate (1 mM). Afterwards, homogenates were centrifuged at 16000 x g for 1 min at room  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 temperature and supernatant fractions were saved for protein determination,<sup>4</sup> by using bovine serum  
4 albumin (BSA) as standard. Then, equivalent amounts of protein from each sample (~ 40 µg) were  
5 mixed with Laemmli's gel loading buffer [50 mM Tris, 10% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 10% (v/v)  
6 2-mercaptoethanol and 2 mg/ml bromphenol blue] in a ratio of 1:1, boiled for 5 min and electrophoresed  
7 in a 10% polyacrylamide minigel for 4 h 15 mA/gel. Proteins were transferred onto nitrocellulose  
8 membranes (GE HealthCare) according to the electrotransfer (Bio-Rad) manufacturer's instructions  
9 (2 h, 100 V) and transferred bands were visualized with 0.3% (w/v) Red Ponceau S (Sigma) in 3% (w/v)  
10 trichloroacetic acid solution to be photodocumented (ImageQuant™ 350, GE HealthCare). For  
11 immunoblotting procedures, SNAP i.d. (Merck Millipore) quick immunoblot vacuum system was used  
12 and membranes were washed with water and then blocked in 0.5% (w/v) non-fat dry milk (Nestlé) in  
13 wash buffer [TEN-Tween 20 solution (0.1% w/v); TEN is 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl,  
14 pH 7.4]. Membranes were washed three times with wash buffer and incubated for 10 min with mouse  
15 anti-human HSP70 monoclonal antibody (Sigma H5147) which recognizes both the 73-kDa constitutive  
16 HSC70 (HSPA8 gene) and the 72-kDa inducible HSP70 (HSPA1A gene) forms, at 1:1,000 dilution.  
17 After three washings with wash buffer, peroxidase-labeled rabbit anti-mouse IgG (Sigma A9044) was  
18 utilized as secondary antibody, at 1:10,000 dilution. As a gel loading control, peroxidase-labeled mouse  
19 anti-human β-actin monoclonal antibody (Sigma A3854) was used at 1:25,000 dilution. Blot  
20 visualization was acquired for 600 s by using ECL-Prime Western blotting Reagent (GE Healthcare,  
21 UK) in ImageQuant™ 350 chemiluminescence system (GE) and accompanying online stacking imaging  
22 software ImageQuant TL 7.0 (GE). Data are given as the mean ± s.e.m. of expressions normalized in  
23 terms of β-actin.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

### 33 34 35 *Statistical analyses*

36 Results were subjected to multivariate analysis of variance (ANOVA) to track type I errors  
37 through an array of univariate tests. Levene's test was used to detect deviations from homoscedasticity  
38 between the test groups. When ANOVA (*one way*) detected significance, comparisons between time and  
39 treatment test groups were made and, whenever P values were less than 0.05, statistically significant  
40 differences were identified by the multiple comparison procedure of Tukey-Kramer Multiple  
41 Comparisons Test. All statistical calculations were performed using GraphPad InStat 3.0 software for  
42 Windows.  
43  
44  
45  
46  
47

### 48 49 **RESULTS**

50 As shown in Fig. 1 (glycaemic values are shown; each group's insulinaemia figures are given in  
51 the text below), both regular (STIIH group) and Detemir (LTIH group) insulin injections (1 IU/kg)  
52 evoked similar IIR up to 120 min post-injection (STIIH lowest values were =  $2.13 \pm 0.43$  mM glucose  
53 and  $3.12 \pm 0.71$  µIU/mL insulin). However, while STIIH group evolved towards higher glycaemic  
54 values from this point to the plateau reached at 240 min ( $4.08 \pm 0.28$  mM glucose;  $< 2.4$  µIU/mL  
55 insulin), Detemir insulin-treated animals still showed decreasing glycaemic marks up to 240 min (LTIH  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

lowest values were  $1.56 \pm 0.14$  mM glucose and  $136.5 \pm 27.9$   $\mu$ U/mL insulin) from which glycaemia tended to normalize at point 600 min, where insulin levels were  $110.8 \pm 16.8$   $\mu$ U/mL. Hence, during the lapse of the first 120 min, STIIH rats were subject to a short episode of hyperinsulinaemic hypoglycaemia while, after that, STIIH group provided a model of euinsulinaemic hypoglycaemia which was stabilized 240 min after the regular insulin injection. On the other hand, to LTIH animals a hyperinsulinaemic hypoglycaemia was imposed during all the observational time, with insulin levels varying from a maximum of  $254.5 \pm 5.56$   $\mu$ U/mL (15 min) to a minimum of  $110.8 \pm 16.8$  (600 min) which tended to be maintained roughly constant up to 720 min ( $106.3 \pm 21.7$   $\mu$ U/mL).

In order to investigate whether hyperinsulinaemia or hypoglycaemia predominantly influences the production of extracellular HSP72 and its release into the plasma, another set of rats was submitted to the same above protocol, except that the animals were killed at each indicated points (instead of being online monitored), as depicted in Fig. 2. It is clear from Fig. 2C that the lowest HSP72 values were those obtained in fed animals and that fast, despite being of 6 h (STIIH) or 15 h (LTIH), evoked a minimal alteration which was equal when STIIH and LTIH were compared. HSP72 plasma levels continued to be statistically identical between both groups at 15 min (the time when insulin concentration in LTIH was maximal) although hypoglycaemia was found to be more severe in STIIH rats at this time point. Maximal HSP72 concentrations were registered 60 min after insulin injections, so just half an hour after the lowest glycaemic values found for both groups. At this point, insulin levels continued to be elevated in LTIH group ( $226.87 \pm 14.18$   $\mu$ U/mL), while insulin in STIIH animals started to decline (Fig. 2B). After this point, plasma HSP72 concentrations started to decrease in parallel in both groups, reaching basal levels at 120 min, a time in which STIIH animals were back to fast insulin values while LTIH rats were found to be facing hyperinsulinaemic plateau.

As stated in the introduction, it has been often found a close correlation between extracellular HSP72 and the plasma levels of inflammation-related cytokines. Because of this, we checked HSP72 levels out comparing them with those of TNF $\alpha$  (an inflammatory cytokine), IL-10 (anti-inflammatory) and IL-6 (an anti-inflammatory cytokine released upon inflammatory stimulus) in both test groups. As shown in Table 1, only STIIH induced by both 6 h fast ( $t=0$ ) and insulin ( $t=15$  and 60 min) was able to enhance HSP72 levels significantly as compared to fed controls. Moreover, this pattern was accompanied by a conspicuous rise in IL-6, but not in IL-10 or TNF $\alpha$ . On the other hand, LTIH, in spite of being induced by 15 h fast or 15 h fast plus 4 h after insulin injection, was found not to interfere in HSP72 plasma levels, while enhancing IL-6 values. Hence, we evaluated the effects of the same maneuvers and times on the expressions of HSP72 and HSP73 in the gluconeogenic tissues liver and kidney. Similarly to that found for plasma HSP72 and cytokine levels, STIIH was more effective in rising HSP72 expression in the liver (Fig. 3A). During the hyperinsulinaemic hypoglycaemic STIIH rats, hepatic HSP72 expression rose by 81% ( $p<0.05$ ) at 60 min after insulin injection as compared to control (Fast 6 h  $t=0$ ) values, which was in parallel to that observed for plasma HSP72 levels (Fig. 2C). This pattern of elevation persisted up to 180 min, during the euinsulinaemic hypoglycaemic period for STIIH rats, in which plasma levels of glucose and insulin were  $3.41 \pm 0.53$  mM and  $< 2.4$   $\mu$ U/mL respectively (Fig. 3A). Similar results were observed for LTIH groups in that livers from 15 h fast

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

insulin-treated animals showed a small (approx 15%) but significant enhancement in HSP72 expression as compared to its time-zero controls. Also, when compared the two time-zero control groups (Fast 15 h vs Fast 6 h), a significant difference was found in that prolonged fast groups presented a *ca.* 20% higher HSP72 expression than its 6 h fast counterpart. None of the maneuvers interfered in the expression of the constitutive HSP73 in the liver and no alteration was observed in the kidney for HSP72 and HSP73 either. We also assayed thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), a measure of lipoperoxidation that could be originated from some insulin-induced injury to the tissues, but we found no difference in either liver or kidney TBARS under all test protocols (data not shown).

The above results may suggest that it is the fall of glycaemia below some certain point, but not IHH, the triggering factor for HSP72 elevation in the plasma, particularly because in LTIH group insulin levels still remained elevated at the time point  $t=4$  h, while HSP72 levels were not sustained in parallel. If insulin itself were the agent for HSP72 rise in the plasma, the 15 h fast animals at  $t=4$  h should present some response to the high insulin concentrations.

## DISCUSSION

Despite the fact that maximal plasma insulin immunoreactivity attained after the injection of Detemir or regular insulin had been quite different ( $254.57 \pm 5.56$  vs  $82.76 \pm 6.28$   $\mu\text{IU/mL}$  at 15 min post-injection, respectively), the minimal correspondent glycaemic values were not as discrepant as ( $1.56 \pm 0.14$  vs  $2.13 \pm 0.43$  mM; Fig. 1), as HSP72 plasma levels were also not so. In fact, 30 min after the administration of insulin (so, 15 min after insulin peaks), glycaemic curves already presented a nadir which was followed by the maximal HSP72 levels at time 60 min (Fig. 2). In this case, insulin levels as higher as 3 times in LTIH as compared to STIH groups were not sufficient to induce a parallel rise in HSP72 of the same magnitude. Also, in both test groups, the progression from the fed ( $82.23 \pm 40.20$   $\mu\text{IU/mL}$  insulin) towards fast state ( $< 2.4$   $\mu\text{IU/mL}$ ) evoked similar HSP72 enhancements. Therefore, HSP72 is negatively correlated with insulin levels but positively with hypoglycaemic episodes. Furthermore, the decreased glycaemia induced by fasting seems not relevant, because a 6 h or a 15 h period of food deprivation evoked the same rise in HSP72 levels as compared to fed controls (Table 1). Altogether, the present findings suggest that extracellular HSP72 (eHSP72) is encountered in the plasma in response to a fall in glycaemia.

eHSP72 delivered into the extracellular space was first shown in heat-shocked rat embryo cells by Hightower & Guidon in 1989,<sup>22</sup> and was unequivocally demonstrated to be exported via non-canonical vesicular mechanisms, namely through exosome-dependent trafficking.<sup>31</sup> Exosomes are small microvesicles (30-100 nm) that are released from late endosomal compartments, after the fusion with the plasma membrane of multivesicular bodies (MVBs) containing internal vesicles.<sup>25</sup> Since exosome delivery is calcium-dependent,<sup>38</sup> it is much likely that catecholamine release during hypoglycaemia-dependent sympathetic activation is the triggering factor behind quick eHSP72 liberation into the plasma; not insulin, whose action is much more time consuming. So it is plausible that, during a hypoglycaemic episode,  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation elicits HSP72 secretion, at the same time

1  
2  
3 catecholamines enhance hepatic glycogenolysis-dependent release of glucose into the blood also via  
4  $\alpha_1$ -adrenergic receptors, in order to protect the whole body from a threatening low glucose level. This is  
5 in line with the observation that physical exercise rapidly elevates serum HSP72 levels,<sup>43,13</sup> while the  
6 administration of glucose to humans abrogates exercise-induced increase in circulating HSP72.<sup>17</sup> Even  
7 teleologically, it is much more pertinent a quick stress-related response (hormonal and/or neural) being  
8 related to a homeostatic challenge (e.g. hypoglycaemia, exercise, the fight-or-fly of the prey) than an  
9 anabolic hormonal signal (insulin) which would demand a more elaborated and longstanding response.  
10 Of course, the participation of other counterregulatory mechanisms cannot be dismissed, but the rapid  
11 and stress-induced adrenergic response appears to be the prevalent mechanism.

12  
13  
14  
15  
16 If, on the one hand, insulin seems not to be responsible for eHSP72 release under hypoglycaemic  
17 situations, one cannot discard the possibility that the hormone was the triggering factor for the elevation  
18 of HSP72 expression observed in the liver some hours after IHH (Fig. 3). In fact, insulin has been found  
19 to induce HSP72 gene expression in human hepatoma cells, in a dose-dependent manner which  
20 correlates with the dissociation constant of the insulin receptor, thus suggesting that the insulin effect is  
21 mediated by the insulin receptor.<sup>42</sup> Indeed, HSP72 and HSP73, at the intracellular compartment, play an  
22 important role for insulin receptor posttranslational processing that may lead to its accumulation or  
23 degradation inside the cell.<sup>39</sup> Furthermore and besides insulin direct effects, hypoglycaemia *per se*  
24 seems to induce a delayed but sustained HSP72 expression, as observed in mouse neuroblastoma cells,<sup>40</sup>  
25 whereas Bergstedt and co-workers<sup>2</sup> have shown, *in vivo*, that severe IHH induces a stress response in rat  
26 neurons in the recovery phase that elicits prolonged expression of HSP72 in surviving neurons. In this  
27 study, the authors suggest that HSP72 expression may be a protective response to injurious stress, which  
28 was corroborated by the finding that heat shock-induced HSP72 expression ameliorates hypoglycaemic  
29 damage to cerebral endothelial cells.<sup>19</sup> Further studies are needed to address why HSP72 expression due  
30 to fast and IHH takes place only in the liver but not in the kidney.

31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
Previous results from our group have shown that IL-6, at physiological concentrations, directly  
promotes insulin secretion by rodent islets and  $\beta$ -cells,<sup>28</sup> while IL-6 was also found to increase insulin-  
stimulated glucose disposal in humans.<sup>6</sup> Moreover, in a hyperinsulinaemic euglycaemic/hypoglycaemic  
clamp study, it has been shown that hypoglycaemia downregulates endotoxin-induced production of  
TNF $\alpha$ , but does not affect IL-1 $\beta$ , IL-6 or IL-10.<sup>10</sup> Hence, we tested whether inflammation-related  
cytokines could be associated with either hypoglycaemia, insulinaemia or both. In fact, the present  
results indicated that short-term food deprivation itself induces a conspicuous 5-fold rise in IL-6 plasma  
levels, as compared to fed control group, and that insulin can enhance this difference even more  
(Table 1). Interestingly, however, in animals submitted to a longer period of fast (15 h), IL-6 response  
was practically suppressed in comparison with fed controls, although insulin had increased it 7-fold.  
While our results are in line with those by others,<sup>12</sup> in which hypoglycaemia has also been found to  
elevate IL-6 levels in healthy men and women, the reason why this effect was only observed upon short  
fast periods remains to be elucidated.

IL-6 is frequently observed in the circulation in response to most stimuli that also induce  
eHSP72 secretion into the blood stream. Accordingly, IL-6 is delivered into the plasma soon after the

1  
2  
3 initiation of physical exercise while IL-6 activates HSP72 gene expression in human skeletal muscle.<sup>15</sup>  
4 As observed for eHSP72,<sup>17</sup> glucose ingestion also attenuates IL-6 release from the contracting muscle.<sup>16</sup>  
5 Finally, IL-6 has been found to be sorted to Ca<sup>2+</sup>-dependent regulated secretory pathway in neural  
6 cells,<sup>33</sup> whereas muscle-derived IL-6 is dependent on signaling cascades initiated by both Ca<sup>2+</sup>-  
7 dependent and -independent stimuli in a way that seems to aid in maintaining metabolic homeostasis  
8 during periods of altered metabolic demand, such as muscular exercise or insulin stimulation.<sup>14</sup> This  
9 strongly sheds light on a possible connection between sympathetic nervous system activation and the  
10 secretion of both IL-6 and eHSP70 acting as frank glucose imbalance-stress related cytokines. Also, it is  
11 likely that catecholamines induce the secretion of both via the exosome pathway.  
12  
13  
14  
15

16 Taken together the above observations suggest that, at short term, HSP72 is released under  
17 hypoglycaemic conditions as a part of the homeostatic stress response (possibly via catecholamine-  
18 induced exosome-dependent secretion), whereas at long term, both hypoglycaemia and insulin may  
19 influence HSP72 expression in the liver, but not in kidneys. Whether secreted eHSP72 is either purely a  
20 danger signal to all the tissues of the body for the enhancement of immune and metabolic surveillance  
21 state,<sup>21</sup> or actively participates in glycaemic control under stressful situations is now under investigation  
22 in our laboratories.  
23  
24  
25  
26

#### 27 SIGNIFICANCE OF THE PRESENT FINDINGS

28 The inducible expression of the 70 kDa family of heat shock proteins (HSP70) is associated with  
29 homeostatically stressful situations, not only heat. Indeed, many homeostatic-threatening situations are  
30 able to induce the production of HSP70 molecules which may act both intracellularly and being  
31 exported to the extracellular milieu, where HSP70 proteins apparently works as danger signals to elevate  
32 the state of surveillance of all the cells around the body. Since a variety of situations that involve  
33 sympathetic nervous system activation, including  $\alpha_1$ -adrenergic agonists and physical exercise, are  
34 capable of inducing HSP70 expression and release of the major HSP70 inducible form, HSP72 (encoded  
35 by *HSPA1A* gene), we decided to investigate whether the predominant signal for HSP70 expression and  
36 delivery into the blood comes from either low glucose, high insulin or both in two different models of  
37 insulin-induced hypoglycaemia (IIH). Our data and observations from other studies suggest that, at short  
38 term, HSP72 is released under hypoglycaemic conditions as a part of the homeostatic stress response  
39 (possibly via catecholamine-induced exosome-dependent secretion). This was observed in parallel with  
40 up to 7-fold increases in interleukin-6 (IL-6) but not IL-10 or tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) at short-  
41 term hypoglycaemia, whereas at long term, both hypoglycaemia and insulin may influence HSP72  
42 expression in the liver, but not in kidneys. Whether secreted eHSP72 is either purely a danger signal to  
43 all the tissues of the body for the enhancement of immune and metabolic surveillance state or actively  
44 participates in glycaemic control under stressful situations is now under investigation in our  
45 laboratories.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by grants received from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grants from MCT/CNPq, MS/DECIT, CT-CIOTEC and CTSaúde, process #551097/2007-8, 563870/2010-9, 402626/2012-5 and 402364/2012-0, to PIHBJ and RBB) and Fundação Araucária (to RBB). TGH was supported by a fellowship from CAPES-Brasília while SPS and PRN were supported by fellowships from CNPq. All the authors have agreed to the submission and had final approval of the submitted and published versions.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest and no competing interests such as consultancies, financial involvement, patent ownership, etc. in relation to the work described.

## REFERENCES

1. Barrena HC, Gazola VA, Furlan MM, Garcia RF, de Souza HM, Bazotte RB. Ketogenesis evaluation in perfused liver of diabetic rats submitted to short-term insulin-induced hypoglycaemia. *Cell Biochem Funct* 2009; 27: 383-387.
2. Bergstedt K, Hu BR, Wieloch T. Initiation of protein synthesis and heat-shock protein-72 expression in the rat brain following severe insulin-induced hypoglycaemia. *Acta Neuropathol* 1993; 86: 145-153.
3. Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol* 1994 38:1-17.
4. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
5. Brown ET, Umino Y, Loi T, Solessio E, Barlow R. Anesthesia can cause sustained hyperglycaemia in C57/BL6J mice. *Vis Neurosci* 2005; 22: 615-618.
6. Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G, Prelovsek O, Hohnen-Behrens C, Watt MJ, James DE, Kemp BE, Pedersen BK, Febbraio MA. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 2006; 55: 2688-2697.
7. Carrara MA, Batista MR, Saruhashi TR, Felisberto AM, Jr., Guilhermetti M, Bazotte RB. Coexistence of insulin resistance and increased glucose tolerance in pregnant rats: a physiological mechanism for glucose maintenance. *Life Sci* 2012; 90: 831-837. doi: 10.1016/j.lfs.2012.03.037.
8. Chang Y, Chen TL, Sheu JR, Chen RM. Suppressive effects of ketamine on macrophage functions. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204: 27-35.
9. Chin JH, Okazaki M, Hu ZW, Miller JW, Hoffman BB. Activation of heat shock protein (hsp)70 and proto-oncogene expression by alpha1 adrenergic agonist in rat aorta with age. *J Clin Invest* 1996; 97: 2316-2323.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

10. De Galan BE, Netea MG, Smits P, van der Meer JW. Hypoglycaemia downregulates endotoxin-induced production of tumour necrosis factor-alpha, but does not affect IL-1beta, IL-6, or IL-10. *Cytokine* 2003; 22: 71-76.
11. De Maio A, Vazquez D. Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. *Shock* 2013; 40: 239-246. doi:10.1097/SHK.0b013e3182a185ab.
12. Dotson S, Freeman R, Failing HJ, Adler GK. Hypoglycaemia increases serum interleukin-6 levels in healthy men and women. *Diabetes Care* 2008; 31: 1222-1223. doi: 10.2337/dc07-2243.
13. Febbraio MA, Ott P, Nielsen HB, Steensberg A, Keller C, Krstrup P, Secher NH, Pedersen BK. Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. *J Physiol* 2002; 544: 957-962.
14. Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J* 2002; 16: 1335-1347.
15. Febbraio MA, Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Hiscock N, Pedersen BK. IL-6 activates HSP72 gene expression in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 1264-1266.
16. Febbraio MA, Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Nielsen HB, Krstrup P, Ott P, Secher NH, Pedersen BK. Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. *J Physiol* 2003; 549: 607-612.
17. Febbraio MA, Mesa JL, Chung J, Steensberg A, Keller C, Nielsen HB, Krstrup P, Ott P, Secher NH, Pedersen BK. Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans. *Cell Stress Chaperones* 2004; 9: 390-396.
18. Giraldo E, Multhoff G, Ortega E. Noradrenaline increases the expression and release of Hsp72 by human neutrophils. *Brain Behav Immun* 2010; 24: 672-677.
19. Gobbel GT, Chan TY, Chan PH. Amelioration of hypoxic and hypoglycaemic damage to cerebral endothelial cells. Effects of heat shock pretreatment. *Mol Chem Neuropathol* 1995; 24: 107-120.
20. Hageman J, van Waarde MA, Zylicz A, Walerych D, Kampinga HH. The diverse members of the mammalian HSP70 machine show distinct chaperone-like activities. *Biochem J* 2011; 435: 127-142.
21. Heck TG, Scholer CM, Homem de Bittencourt PI. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochem Funct* 2011; 29: 215-226. doi: 10.1002/cbf.1739.
22. Hightower LE, Guidon PT, Jr. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J Cell Physiol* 1989; 138: 257-266.
23. Johnson JD, Campisi J, Sharkey CM, Kennedy SL, Nickerson M, Fleshner M. Adrenergic receptors mediate stress-induced elevations in extracellular Hsp72. *J Appl Physiol (1985)* 2005; 99: 1789-1795.
24. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14: 105-111. doi: 10.1007/s12192-008-0068-7.
25. Keller S, Sanderson MP, Stoek A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* 2006; 107: 102-108.

<http://mc.manuscriptcentral.com/cbf>

- 1
  - 2
  - 3
  - 4
  - 5
  - 6
  - 7
  - 8
  - 9
  - 10
  - 11
  - 12
  - 13
  - 14
  - 15
  - 16
  - 17
  - 18
  - 19
  - 20
  - 21
  - 22
  - 23
  - 24
  - 25
  - 26
  - 27
  - 28
  - 29
  - 30
  - 31
  - 32
  - 33
  - 34
  - 35
  - 36
  - 37
  - 38
  - 39
  - 40
  - 41
  - 42
  - 43
  - 44
  - 45
  - 46
  - 47
  - 48
  - 49
  - 50
  - 51
  - 52
  - 53
  - 54
  - 55
  - 56
  - 57
  - 58
  - 59
  - 60
26. Kolberg A, Rosa TG, Puhl MT, Scola G, da Rocha Janner D, Maslinkiewicz A, Lagranha DJ, Heck TG, Curi R, Homem de Bittencourt PI, Jr. Low expression of MRP1/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumour-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. *Cell Biochem Funct* 2006; **24**: 23-39.
27. Krause MS, McClenaghan NH, Flatt PR, Homem de Bittencourt PI, Murphy C, Newsholme P. L-arginine is essential for pancreatic beta-cell functional integrity, metabolism and defense from inflammatory challenge. *J Endocrinol* 2011; **211**: 87-97. doi: 10.1530/JOE-11-0236.
28. Krause MS, Bittencourt A, Homem de Bittencourt PI, Jr., McClenaghan NH, Flatt PR, Murphy C, Newsholme P. Physiological concentrations of interleukin-6 directly promote insulin secretion, signal transduction, nitric oxide release, and redox status in a clonal pancreatic beta-cell line and mouse islets. *J Endocrinol* 2012; **214**: 301-311.
29. Krenek S, Schlegel M, Berendonk TU. Convergent evolution of heat-inducibility during subfunctionalization of the Hsp70 gene family. *BMC Evol Biol* 2013; **13**: 49. doi: 10.1186/1471-2148-13-49.
30. Lacoste A, Malham SK, Cueff A, Poulet SA. Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via a beta-adrenergic receptor-cAMP signaling pathway. *Gen Comp Endocrinol* 2001; **122**: 252-259.
31. Lancaster GI, Febbraio MA. Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem* 2005; **280**: 23349-23355.
32. Liu Y, Gampert L, Nething K, Steinacker JM. Response and function of skeletal muscle heat shock protein 70. *Front Biosci* 2006; **11**: 2802-2827.
33. Moller JC, Kruttgen A, Burmester R, Weis J, Oertel WH, Shooter EM. Release of interleukin-6 via the regulated secretory pathway in PC12 cells. *Neurosci Lett* 2006; **400**: 75-79.
34. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; **18**: 571-573.
35. Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1996; **1**: 97-98.
36. Rodrigues R, Feitosa KP, Felisberto-Junior AM, Barrena HC, Curi R, Bazotte RB. Comparative effects of short-term and long-term insulin-induced hypoglycaemia on glucose production in the perfused livers of weaned rats. *Pharmacol Rep* 2011; **63**: 1252-1257.
37. Saha JK, Xia J, Grondin JM, Engle SK, Jakubowski JA. Acute hyperglycaemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005; **230**: 777-784.
38. Savina A, Furlan M, Vidal M, Colombo MI. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* 2003; **278**: 20083-20090.
39. Sawa T, Imamura T, Haruta T, Sasaoka T, Ishiki M, Takata Y, Takada Y, Morioka H, Ishihara H, Usui I, Kobayashi M. Hsp70 family molecular chaperones and mutant insulin receptor: differential binding specificities of BiP and Hsp70/Hsc70 determines accumulation or degradation of insulin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **218**: 449-453.
40. Shyu WC, Chen CP, Saeki K, Kubosaki A, Matusmoto Y, Onodera T, Ding DC, Chiang MF, Lee YJ, Lin SZ, Li H. Hypoglycaemia enhances the expression of prion protein and heat-shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cell line. *J Neurosci Res* 2005; **80**: 887-894.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

41. Souza HM, Hell NS, Lopes G, Bazotte RB. Synergistic effect of counterregulatory hormones during insulin-induced hypoglycaemia in rats: the participation of lipolysis and gluconeogenesis to hyperglycaemia. *Acta Pharmacol Sin (Zhongguo Yao Li Xue Bao)* 1996; 15: 455-459.
42. Ting LP, Tu CL, Chou CK. Insulin-induced expression of human heat-shock protein gene hsp70. *J Biol Chem* 1989; 264: 3404-3408.
43. Walsh RC, Koukoulas I, Garnham A, Moseley PL, Hargreaves M, Febbraio MA. Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell Stress Chaperones* 2001; 6: 386-393.

For Peer Review



Table 1. Blood concentrations of heat shock protein-72 (HSP72), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).

	HSP72 (ng/mL)	IL-6 (pmol/mL)	IL-10 (pmol/mL)	TNF $\alpha$ (pg/mL)
Control Fed t = 0	0.0 $\pm$ 0.0	4.4 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.4
<b>Short-term hypoglycaemia:</b>				
Fast 6 h Control t = 0	1.3 $\pm$ 0.1*	23.5 $\pm$ 0.1*	5.4 $\pm$ 4.0	3.1 $\pm$ 1.4
Fast 6 h + RegIns t = 15 min	1.9 $\pm$ 0.1*	17.9 $\pm$ 0.7*	7.2 $\pm$ 5.0	1.8 $\pm$ 0.2
Fast 6 h + RegIns t = 60 min	3.1 $\pm$ 0.2*	44.9 $\pm$ 0.5*	11 $\pm$ 16	3.4 $\pm$ 1.1
<b>Long-term hypoglycaemia:</b>				
Fast 15 h Control t = 0	0.8 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.5	5 $\pm$ 8	2 $\pm$ 2
Fast 15 h + DetIns t = 4 h	0.04 $\pm$ 0.01	18.4 $\pm$ 0.1*	33 $\pm$ 20	14 $\pm$ 16

Blood samples were obtained at different times from control (fed) or hypoglycaemic rats. For short-term hypoglycaemia (STIH), blood samples were obtained from 6 h fasted rats which received i.p. Regular insulin (RegIns) having blood collected 15 or 60 min after insulin injection (1 IU/kg), while long-term insulin induced hypoglycaemia (LTIH) were obtained in 15 h fasted rats which received i.p. Detemir insulin (DetIns) with blood collection until 4 h after insulin injection (1 IU/kg), as described in the Methods section. Values are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of 3-5 experiments performed in duplicates.

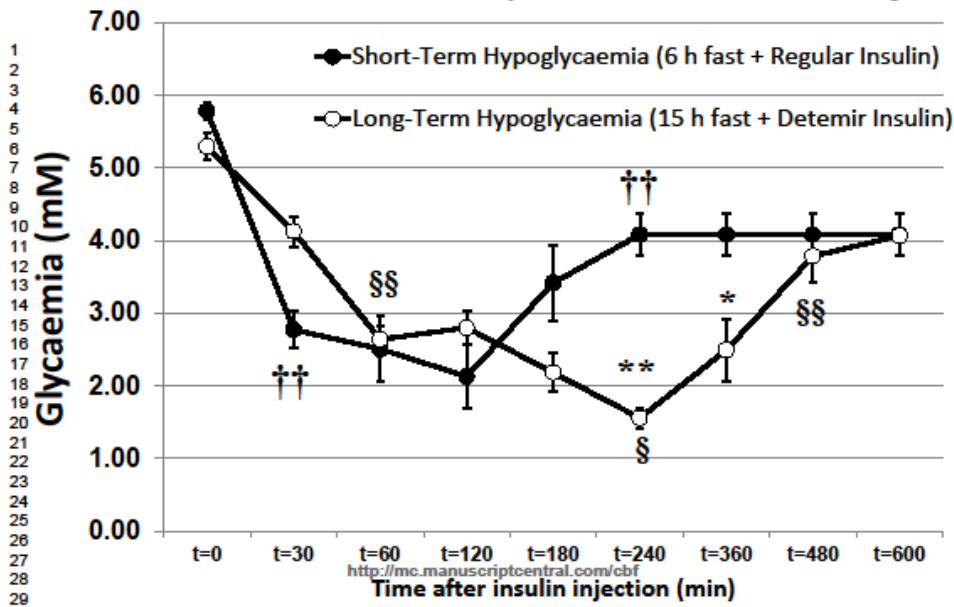
\*p < 0.001 for the comparison with control (fed) group by one-way ANOVA and Tukey-Kramer multiple comparisons test. No other differences were found between any of the tested groups. HSP72 valued 0.0  $\pm$  0.0 means that all the measurements had given figures below the limit of detection.

## FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Time-course of hypoglycaemia after insulin administration. For Short-Term Insulin-Induced Hypoglycaemia (STIIH, closed circles), the animals were 6 h fasted and i.p. injected with 1 IU/kg regular insulin while for Long-Term Insulin-Induced Hypoglycaemia (LTIH, open circles), the animals were 15 h fasted and i.p. injected with 1 IU/kg Detemir insulin so that total fasting time were 10 h for STIIH and 25 h for LTIH. Data are the mean  $\pm$  s.e.m. of 7-13 different experiments performed by using real time continuous glucose monitoring system (RT-CGMS) and confirmed by conventional glucose oxidase-based assay as described in Materials and Methods. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , for the comparison between Regular and Detemir insulin treatments in each time point; † $p < 0.05$  and ††  $p < 0.01$ , for multiple comparisons between two consecutive time points within Regular insulin injection; §  $p < 0.05$  and §§  $p < 0.01$ , for multiple comparisons between two consecutive time points within Detemir insulin administration. Statistics is described in the Methods section.

Figure 2. Comparative profile of plasma glucose, insulin and HSP72 evolvement after insulin administration. For both Short-Term Insulin-Induced Hypoglycaemia (STIIH, closed circles) and Long-Term Insulin-Induced Hypoglycaemia (LTIH, open circles). The procedures are described in the legend of Fig. 1, except that the rats were killed at the indicated time points for glucose, insulin and HSP72 plasma measurements. Data are the mean  $\pm$  s.e.m. of 3 different experimental preparations, each in triplicates. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , for the comparison between Regular and Detemir insulin effects in each time point; † $p < 0.05$  and ††  $p < 0.01$ , for multiple comparisons between two consecutive time points within Regular insulin injection; §  $p < 0.05$  and §§  $p < 0.01$ , for multiple comparisons between two consecutive time points within Detemir insulin group. Statistics is described in the Methods section.

Figure 3. HSP70 protein expression in liver (A) and kidney (B) of rats submitted to short-term insulin-induced hypoglycaemia (STIIH) and long-term insulin-induced hypoglycaemia (LTIH). The procedures were as described in the legend of Fig. 1, except that the rats were killed at the indicated time points for liver and kidney surgical excision and protein analysis by SDS-PAGE and immunoblot for the main constitutive (HSP73, *HSPA8* gene) and inducible (HSP72, *HSPA1A* gene) forms of HSP70. Open rectangles in (a) and (b) represent Hyperinsulinaemic Hypoglycaemic periods while in (c) represents the Euninsulinaemic Hypoglycaemic period. Data, expressed in terms of HSP70 expressions relative to  $\beta$ -actin expression in the same gels, are the mean  $\pm$  s.e.m. of 4 different preparations performed in doubles. A gel representative of the observed means relative to liver and kidney results is given for each case. \* $p < 0.01$ , for the comparison between LTIH at time zero (Fast 6 h-Control  $t=0$ ) and STIIH at time zero (Fast 15 h-Control  $t=0$ ); † $p < 0.05$ , for multiple comparisons between two consecutive time points within each group.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

