

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

LINO PINTO DE OLIVEIRA JUNIOR

**INDUÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO
(HSP) MEDIADA PELO ÓXIDO NÍTRICO EM RESPOSTA AO
EXERCÍCIO DE RESISTÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas – Fisiologia, do Instituto de Ciências
Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor

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

Co-orientador: Prof. Dr. Álvaro Reischak de Oliveira

Porto Alegre

2005

LINO PINTO DE OLIVEIRA JUNIOR

**A INDUÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS DE CHOQUE
TÉRMICO (HSP) MEDIADA PELO ÓXIDO NÍTRICO EM
RESPOSTA AO EXERCÍCIO DE RESISTÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e analisada pela **Comissão Examinadora** formada pelos seguintes professores:

Orientadores:

Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr

Prof. Dr. Álvaro Reischak de Oliveira

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Norma Anair Possa Marroni
(RELATORA)

Profa. Dra. Christiane Salbego

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

*“Você pensa que entrará no Jardim da Bem-Aventura sem as provações que
afligiram àqueles que entraram antes de você?”
Alcorão, apud Joseph Campbell*

*“O critério que estabelece a qualidade de um bom quebra-cabeças nada tem a ver com
o fato de seu resultado ser intrinsecamente interessante ou importante.”
Thomas S. Kuhn*

À Cristina, Daniela, Bernardo e Amparo

AGRADECIMENTOS

Uma vez perguntaram-me como eu conseguia fazer o doutorado estando trabalhando, casado e com filhos. A resposta é uma mulher maravilhosa, filhos fantásticos, um orientador mágico e os amigos. Em todos os momentos pude contar com o apoio de todos. Consegui alçar este degrau com a ajuda de todos vocês e quem tem amigos, como eu tenho, não tem como não conseguir o que quer. A todos os que me acharam merecedor de sua atenção, tempo, dedicação, muito obrigado. Não teria alcançado este momento sem vocês (principalmente àqueles a quem injustamente esqueci de citar, mas como disse meu colega Bonatto, é a emoção). A todos agradeço por este momento. Muito obrigado.

A quem começou toda minha história na fisiologia: Carmen Mundt

Aos Mestres de ontem: Alcyr, Norma, Jurema, Beatriz, Cláudia, Roselis, Maria Marques, Belló, Paulo, Marli, Pozzer, Egon, Lenita, Perry, Iara, Aldo, Abílio, Alice, Carmosina,...

Aos colegas e amigos de ontem: Anete, Humberto, Denise, Marcelo, Luís, Rosa, Renata, Nora, Kranz, Maria Inês, Glória, Uiraçara, Cid, Roberto, Seu Hernandi, Lizete, Kanan, Gilberto,...

Aos Mestres de hoje: Roselis, Norma, Maria Marques, Vera, Perry, Adriane, Cláudia, Adroaldo, Miriam, Luís, Denise, Heloísa, Maria Flávia, Ilma, Polimara, Vânia,...

Aos colegas e amigos: Maurício, Elza, Mariana, Damiana, Bonatto, Lazzarotto, Daiane, Juliane, Bibiana, Ângela (B1), Alexandre (Baby), Denise (Dedé), Tiago, Gustavo, Benjamin, Lisiane, Júlia, Tatiana, André (Gordo), Minéia, Augustus,

Joelso, Patrícia, Lucila, Sueli, Gabriela, Cristina, Ana Paula, Guendalina, Vanessa, Márcia, Ana Lúcia, Tânia, Dna Geni...

Aos colegas e amigos da Unisinos: Edson, Áderson, Leandro, Ednaldo, Betinho, Bonatto, Cláudia, Rosemari, Suzana S, Suzana W, Ari Preto, Ari Branco, Gilberto, Rosa, Márcia, Riegel, Maísa, Regina, Fábio,...

Aos meus familiares e os da Cristina. Ah, se não fosse vocês...

Meu especial agradecimento ao Paulo Ivo, meu orientador, à Míriam, orientadora dele e minha e ao Álvaro, meu co-orientador.

RESUMO

A indução de proteínas de choque térmico (HSP) é fundamental nos processos de reparo que seguem diferentes tipos de dano celular. O exercício físico é capaz de induzir a síntese de HSP, o que parece estar relacionado com a prevenção de desnaturação protéica por radicais livres, provável causa dos efeitos duradouros da fadiga de baixa frequência. Por sua vez, a formação de óxido nítrico (NO) também aumenta nas células musculares em contração, podendo determinar estresse oxidativo, ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) e injúria tecidual. No entanto, o NO também induz a síntese de HSP, o que deve causar citoproteção pela inibição da ativação do NF- κ B. Portanto, a geração de NO durante o exercício pode desempenhar um duplo papel, a saber: induzir injúria tecidual ligada à ativação do NF- κ B e; proteger contra a mesma pela indução de HSP que bloqueiam a ativação do primeiro. Neste trabalho investigamos o papel do NO na indução de HSP70 em resposta ao exercício agudo. Com base nos nossos resultados e nas informações disponíveis a partir de outros estudos, podemos concluir que o exercício de natação com uma sobrecarga de 5 % do peso corporal preso ao animal é capaz de aumentar o conteúdo de HSP70 (em até 33%, $p < 0,05$) no músculo esquelético e que este aumento está associado a estresse oxidativo (aumento de 2,4 vezes no índice de estado redox), depleção de reservas energéticas (redução de 47% no conteúdo de glicogênio, $p < 0,05$) e maior produção de NO pelos músculos (em até 1,7 vezes, $p < 0,05$). A administração de L-NAME foi capaz de impedir o aumento no conteúdo de HSP70 induzido pelo exercício, sugerindo que o NO seja um importante mecanismo de indução destas proteínas em resposta ao exercício. No entanto, estudos adicionais são necessários para validar a hipótese de que o NO seja responsável pela indução da síntese de HSP70 em resposta ao exercício de resistência.

ABSTRACT

The induction of heat shock proteins (HSP) is fundamental in the repair processes that follows different types of cellular damage. Physical exercise is capable to induce an increase in the HSP synthesis, which seems to be related with the prevention of protein denaturation by free radicals, a possible cause for the long-term effects of the low frequency fatigue. On the other hand, the production of nitric oxide (NO) increases in the contracting muscle fibers, which could determine oxidative stress, nuclear factor κ B (NF- κ B) activation and tissue injury. However, NO also leads to HSP synthesis which could confers cytoprotection by inhibiting NF- κ B activation. Therefore, NO generation during exercise may play a dual role: to induce tissue injury by the activation of NF- κ B and; to protect against the latter by the induction of HSP which prevents the activation of the first. In this study we investigated the role of NO on the induction of HSP70 synthesis as a function of exercise. As a whole, our results and those by others allow the conclusion that, in rats submitted to a swimming session of 60 min with a 5% body weight overload, there is an increase in skeletal muscle HSP70 (up to 33%, $p < 0,05$) content in association with oxidative stress (a 2.4-fold increase in the redox status), depletion of energetic reserves (reduction of 47% glycogen) and a higher NO production by the muscle fibers (up to 1.7-fold, $p < 0.05$). The NO synthase inhibitor L-NAME was able to prevent the increase in HSP70 muscle cell content thus suggesting that NO may be an important mechanism of exercise-induced HSP70 synthesis. However, further studies must be carried out to confirm the hypothesis that NO is responsible for the induction of HSP70 synthesis by the exercise of endurance.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
SUMÁRIO	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
INTRODUÇÃO	14
1.1. ESTRESSE, PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E CITOPROTEÇÃO.....	14
1.2. HEAT SHOCK FACTORS E A REGULAÇÃO DA RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO.	17
1.3. PAPEL CITOPROTETOR DAS HSP	20
1.4. NF- κ B E A RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO	21
1.5. RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E EXERCÍCIO	24
1.6. NO, HSP E PROTEÇÃO CONTRA INJÚRIA TECIDUAL	30
1.7. EXERCÍCIO, EXPRESSÃO DE HSP, SISTEMA IMUNE E CITOCINAS	35
1.8. MÚSCULO ESQUELÉTICO, EXERCÍCIO E EXPRESSÃO DE HSP	36
1.9. MÚSCULO ESQUELÉTICO, TREINAMENTO FÍSICO E EXPRESSÃO DE HSP	40
2 OBJETIVOS	42
2.1. OBJETIVO GERAL	42
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. ANIMAIS	44
3.2. EXERCÍCIO	45
3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	47
3.3.1. Experimentos para avaliar o esforço dos animais submetidos ao exercício	47
3.3.2. Avaliação do estado redox no músculo gastrocnêmio	48
3.3.3. Avaliação da lipoperoxidação através da medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS	48
3.3.4. Avaliação da produção de NO através da estimativa da concentração de nitratos e nitritos no músculo gastrocnêmio.....	48

3.3.5. Avaliação da expressão de HSP70 em resposta ao exercício e da correlação entre a produção de NO e a expressão de HSP70 nos músculos gastrocnêmio e sóleo	49
3.4. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE LACTATO NO PLASMA	50
3.5. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE TECIDO MUSCULAR (GASTROCNÊMIO E SÓLEO) ...	51
3.6. SDS-PAGE E “WESTERN BLOTTING” PARA HSP70	53
3.7. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE GSH E GSSG	60
3.8. ANÁLISE DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	66
3.9. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE GLICOGÊNIO	67
3.10. DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE NITRATOS E NITRITOS NAS AMOSTRAS	69
3.11. CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS NAS AMOSTRAS ANALISADAS	71
3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
4 RESULTADOS	73
4.1. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE LACTATO	73
4.2. EXERCÍCIO E EXPRESSÃO DE HSP	75
4.2.1. Exercício e expressão de HSP no sóleo	75
4.2.2. Exercício e expressão de HSP no gastrocnêmio	76
4.3. ESTRESSE OXIDATIVO	77
4.3.1. Concentração de glutathione	77
4.3.2. Concentração de dissulfeto de glutathione	78
4.3.3. Relação dissulfeto de glutathione/glutathione	79
4.3.4. Conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	80
4.4. GLICOGÊNIO MUSCULAR	81
4.5. EFEITO DO BLOQUEIO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	82
4.5.1. Conteúdo de NO_x^- total	82
4.5.2. Conteúdo de NO_2^-	84
4.5.3. Conteúdo de NO_3^-	85
4.5.4. Expressão de HSP no sóleo	87
4.5.5. Expressão de HSP no músculo gastrocnêmio	89
5 DISCUSSÃO	91
CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP.....	adenosina trifosfato
AMP	adenosina monofosfato
BSA	albumina sérica bovina
CAT	catalase
CDNB	1-Cl-2,4-dinitrobenzeno
CK.....	creatina quinase
DMSO.....	sulfóxido de dimetila
DNP-SG.....	(2,4-dinitrofenil)-S-glutationa
DPEC	dietilpirocarbonato
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]
GRP	proteína regulada por glicose
GRP75	proteína regulada por glicose de 75 kDa
GRP78	proteína regulada por glicose de 78 kDa
GS-conjugado	S-conjugado de glutaciona
GSH	glutaciona (forma reduzida)
GSPx.....	glutaciona peroxidase
GSRd (GSSG redutase)	redutase de dissulfeto de glutaciona
GSSG.....	dissulfeto de glutaciona (forma oxidada de GSH)
GST.....	glutaciona S-transferase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HO-1	heme-oxigenase
HOCl.....	ácido hipocloroso
HS	proteína de estresse
HSC	proteína de choque térmico constitutiva
HSC70	proteína de choque térmico constitutiva de 73 kDa
HSE.....	elemento de ligação dos HSF ao DNA
HSF.....	fator de transcrição para HSP
HSP.....	proteína de choque térmico
HSP60.....	proteína de choque térmico de 60 kDa
HSP70.....	proteína de choque térmico de 72 kDa
HSP73.....	proteína de choque térmico constitutiva de 73 kDa
HSP75.....	proteína de choque térmico de 75 kDa
HSP90.....	proteína de choque térmico de 90 kDa
IAT	limiar anaeróbico individual
IκB	proteína inibitória do NF-κB

IKK	quinase da I κ B
IMP	inosina monofosfato
IFN	interferon
IL	interleucina
LFF	fadiga de baixa frequência
L-NAME	N omega-nitro-L-arginina metil éster
MHC	meromiosina pesada
MOPS	ácido morfolinopropanossulfônico
NEM	N-etil-maleimida
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NO	óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitrito
NO ₃ ⁻	nitrato
NO _x ⁻	nitrito + nitrato
NOS	óxido nítrico sintase
NF- κ B	fator de necrose κ B
O ₂ ⁻	superóxido
OH ⁻	hidroxila
PBS	salina tamponada com fosfato
PFK	fosfofrutoquinase
PIPES	ácido piperazina N-N'-bis-(etanossulfônico)
PMSF	fluoreto de fenil-metil-sulfonila
RNS	espécies reativas do nitrogênio
ROS	espécies reativas do oxigênio
ROI	intermediários reativos do oxigênio
SNOG	S-nitroso glutationa
SOD	superóxido dismutase
TBHP	hidroperóxido de <i>t</i> -butila
TNB	fator de necrose tumoral
TNF	ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Animais.....	44
Figura 2 - Tanques para natação.....	46
Figura 3 - Pesagem dos animais e seleção do lastro.....	46
Figura 4 - Procedimentos para retirada dos músculos.....	52
Figura 5 - Procedimentos após a retirada dos músculos.....	53
Figura 6 - Eletroforese: cuba e tampão de corrida.....	54
Figura 7 - Eletroforese: géis de empilhamento e de corrida.....	54
Figura 8 – Eletroforese: adição do padrão de peso molecular e das amostras.	55
Figura 9 – Manejo dos géis após a corrida eletroforética.....	56
Figura 10 – Eletrotransferência, elementos e princípio.....	57
Figura 11 – Eletrotransferência, cuba BIO-RAD Mini-Protean II.....	57
Figura 12 – Procedimentos de bloqueio da membrana e de “immunoblotting”.....	58
Figura 13 – Sistema VDS para digitalização das membranas.....	60
Figura 14 – Determinação da concentração total de glutathiona n (Anderson, 1985).	61
Figura 15 - Método da reciclagem com DTNB.....	62
Figura 16 – Determinação do conteúdo inicial de GSSG na amostra.	64
Figura 17 – Determinação da concentração inicial de GSSG (Anderson, 1985).	65
Figura 18 – Cálculo da concentração inicial de GSHe.....	66
Figura 21 Expressão relativa de HSP70 no músculo gastrocnêmio de ratos..	76
Figura 22 Concentração de glutathiona (GSH)	77
Figura 23 Concentração de dissulfeto de glutathiona (GSSG).....	78
Figura 24 Comparação da relação GSSG/GSH.....	79
Figura 25 Conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	81
Figura 26 Conteúdo de glicogênio no músculo gastrocnêmio vermelho	82
Figura 27 Conteúdo de NO_x^- total no músculo sóleo de ratos.....	83
Figura 28 Conteúdo de NO_x^- total no músculo gastrocnêmio de ratos.....	84
Figura 29 Conteúdo de NO_2^- no músculo sóleo de ratos.....	85
Figura 30 Conteúdo de NO_2^- no músculo gastrocnêmio de ratos.....	85
Figura 31 Conteúdo de NO_3^- no músculo sóleo de ratos.....	86
Figura 32 Conteúdo de NO_3^- total no músculo gastrocnêmio de ratos.....	87
Figura 33 Expressão relativa de HSP70 no músculo sóleo de ratos.....	88
Figura 34 Expressão relativa de HSP70 no músculo gastrocnêmio de ratos	90

INTRODUÇÃO

1.1 Estresse, proteínas de choque térmico e citoproteção

Diversas estratégias foram desenvolvidas pelas células para lidar com mudanças adversas no ambiente. Entre essas, a resposta de choque térmico, também referida como resposta ao estresse (WELCH, 1992), é a mais conservada (LOCKE E NOBLE, 1995; FEHRENBACH E NIESS, 1999). Ela consiste na rápida expressão de uma classe de proteínas conhecidas como proteínas de choque térmico (LOCKE E NOBLE, 1995; FEHRENBACH E NIESS, 1999), que são essenciais para a sobrevivência de células confrontadas com um agente ambiental estressante (WELCH, 1992).

A natureza universal dessa resposta tem sido continuamente confirmada desde sua descrição inicial por Ritossa em (1962), em células de glândula salivar de *Drosophila busckii*. Segundo este autor, a sujeição das larvas deste inseto a um choque

térmico¹, por 30 min, determinava uma alteração do padrão de espessamento cromossomal². Como esses espessamentos são locais de intensa atividade transcricional, a mudança de padrão evidenciava que o choque térmico havia ativado um conjunto de genes que determinavam a expressão de um grupo específico de proteínas. Ritossa também demonstrou que a variação no padrão de espessamento cromossomal ocorria quando a temperatura atingia rapidamente um valor limiar determinado, e não em resposta a qualquer variação brusca de temperatura de amplitude entre 5 a 6 °C (RITOSSA, 1962).

O termo proteína de choque térmico (HSP³), ou simplesmente proteína de estresse (SP⁴), tem sido usado para as proteínas induzidas por calor (LOCKE E NOBLE, 1995), assim como por outros desafios metabólicos, incluindo análogos de aminoácidos, vários metais pesados, agentes que atacam os grupos sulfidríla das proteínas (como o arsenito de sódio), diversos ionóforos⁵ e venenos metabólicos que afetam a produção de ATP (WELCH, 1992). A expressão de HSP também pode ser induzida por estresse oxidativo, mecânico e por citocinas (FEHRENBACH E NIESS, 1999). Muitos destes agentes estressantes têm em comum a capacidade de afetarem de modo adverso a conformação correta e, conseqüentemente, a função das proteínas (MINOWADA e WELCH, 1995).

A importância das HSP para a manutenção da homeostase celular pode ser avaliada pelo fato destas proteínas constituírem uma classe altamente conservada,

¹ Corropondendo ao aumento de 25 para 30 °C na temperatura do ambiente em que se desenvolvia a larva.

² Esta elevação de temperatura determinava, no cromossoma 2L, o surgimento de espessamentos nas regiões 2L 14, 2L15 e 2L20, além da regressão do espessamento normalmente existente em 2L 8.

³ heat shock/stress proteins

⁴ stress proteins

⁵ proteína que funciona como canal iônico

desde procariotos até o homem (MEYER E DA SILVA, 1999). Elas podem ser agrupadas por suas massas moleculares, em famílias, sendo as mais comuns: HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e HSP30 (27,28 e 30 e p³²-heme-oxigenase). Muitas destas famílias de proteínas têm sido identificadas em células de mamíferos (FEHRENBACH E NIESS, 1999), sendo que o principal grupo de HSP apresenta peso molecular de aproximadamente 70 kDa e ponto isoelétrico entre os pH 5,2 e 6,3 (LOCKE, NOBLE E ATKINSON, 1991). Incluído neste grupo estão as proteínas conhecidas como reguladas pela glicose (GRP⁶) (LOCKE, NOBLE E ATKINSON, 1991) que são induzidas por privação de glicose, influxo de cálcio, exposição prolongada a hipóxia ou agentes que perturbam a N-glicosilação (FEHRENBACH E NIESS, 1999).

As HSP não são induzidas apenas em condições de estresse. Há componentes desta classe de proteínas que são expressos constitutivamente (HSC⁷), ou seja, em células não submetidas a condições de estresse. As formas induzíveis, quando surgem, se somam às constitutivas (MEYER E DA SILVA, 1999). Em células eucarióticas, a família das proteínas de 70 kDa é composta primariamente pela HSP70, que é uma proteína induzível de 72 kDa e da HSC70 que é uma proteína constitutiva de 73 kDa. Os membros desta família possuem um domínio capaz de ligar ATP e outro de ligar peptídeos, e se localizam tanto no compartimento nuclear, como no citoplasmático (WELCH, 1992). Quando estas proteínas atacam uma proteína desnaturada (dobrada de forma inadequada⁸) ou nascente (ainda não dobrada⁹), estabelecem com estas uma ligação através do domínio ligante de peptídeo com o objetivo de impedir agregação

⁶ glucose regulated proteins.

⁷ Heat Shock Cognates

⁸ misfolded

⁹ unfolded

proteína-proteína. Como documentado para a RNA-polimerase, a HSP70 desagrega e reativa as proteínas termicamente danificadas. A energia liberada pela hidrólise do ATP é utilizada para separar a proteína da HSP. A família HSP70 também auxilia no correto dobramento e estabilização de polipeptídeos recém-formados, antes destes assumirem seus estados nativos. Em função destas características, as HSP70 são conhecidas como chaperonas moleculares¹⁰ (WELCH, 1992; ESSIG E NOSEK1997). As HSC70 são encontradas em níveis relativamente altos na maioria das células. Em presença de estresse e da desnaturação de proteínas, as HSC70 migram para o núcleo e nucléolo, onde ligam a pré-ribossomas desnaturados ou que ainda não tenham adquirido a conformação nativa. Acredita-se que HSC70 e HSP70 auxiliem na estabilização de proteínas, sendo que a primeira agiria regularmente, em condições não estressantes, enquanto a segunda seria sintetizada para atender demandas extras impostas à célula sob estresse (ESSIG E NOSEK1997).

1.2 “Heat shock factors” e a regulação da resposta ao choque térmico.

Em células eucarióticas, a regulação dos genes HSP pelo calor requer a ativação e translocação, para o núcleo, de uma proteína transregulatória, o HSF (“heat shock factor”), que reconhece e liga-se a uma seqüência de elementos localizada no promotor do gene HSP, denominada HSE (“heat shock element”) deflagrando o processo de transcrição (SANTORO, 2000 E MEYER,1999). Uma característica-chave do HSE é a presença de segmentos GAA/TCC arranjados periodicamente, a intervalos de dois nucleotídeos. Os blocos GAA provavelmente representam pontos de contato para o HSF, sendo que um HSE funcional inclui um mínimo de três segmentos GAA,

¹⁰ do Inglês, *chaperone* = acompanhante

não consecutivos. É possível que interações HSF-DNA produtivas impliquem no dobramento dos sítios de ligação e que a presença de múltiplos pontos de contato seja pré-requisito para que o fator induza tal dobramento (AMIN et al. 1988). Em mamíferos, nos promotores dos genes das HSP70 e HSP90, o HSE é composto por cinco e seis unidades pentaméricas, respectivamente, em estreita proximidade com os elementos basais dos promotores (SANTORO, 2000). Enquanto um único tipo de HSF foi descrito em fungos e em *Drosophila*, uma família multigene de HSF foi identificada em plantas e vertebrados. A presença de diferentes HSFs na maioria dos eucariotos sugere que a interação entre eles deva ser importante para proteger organismos complexos das diversas formas de alterações ambientais (SANTORO, 2000).

Em um grande número de eucariotos, o HSF1 está presente tanto em células submetidas, como não submetidas a diferentes tipos de estresse. Entretanto, na ausência de estresse, o HSF1 é expresso na forma de um monômero inerte ligado à HSP70 e a outras chaperonas. Na presença de um agente estressante capaz de provocar um súbito aumento na presença de proteínas não-nativas, se estabelece maior necessidade de chaperonas (HSP70, HSP90) para prevenir o surgimento de agregados de proteínas desnaturadas. Conseqüentemente, as chaperonas dissociam-se dos monômeros de HSF1, permitindo que estes assumam um estado trimérico, sejam fosforilados nos resíduos de serina e translocados para o núcleo. A partir deste momento, ligam-se aos HSEs, localizados a montante dos genes HSP, resultando na transcrição induzida por estresse. Com o aumento da síntese de HSP, é restabelecido equilíbrio inicial entre chaperonas livres e ligadas à proteínas não-nativas. As HSP deslocam-se para o núcleo, ligam-se ao domínio ativador de transcrição dos HSF1,

reprimindo novamente o processo de transcrição de genes HSP (SANTORO, 2000, FEHRENBACH E NIESS, 1999).

Além do HSF1, considerado o fator estresse-responsivo rapidamente ativado, existem ainda os HSF2, 3 e 4. O HSF2 (co-expressado) é ativado em resposta a distintos estímulos de desenvolvimento ou diferenciação; Os HSF3, que mostram muitas características semelhantes aos HSF1, são ativados principalmente por exposição a temperaturas extremas e sob condições severas de estresse e parecem ser importantes co-reguladores do HSF1, aumentando a habilidade celular de regular com precisão a resposta ao choque térmico; E finalmente, o HSF4, que parecem ser reguladores negativos da resposta ao choque térmico, reprimindo a expressão dos genes HSP (SANTORO, 2000).

A ativação do HSF induzida por exercício observada em coração de ratos é similar a ativação observada em coração de animais submetidos a choque térmico, sugerindo que o exercício e o choque térmico induzem a expressão de HSP pelo mesmo mecanismo geral. Em alguns casos, a temperatura interna do animal era menor que a necessária para ativação por choque térmico, indicando que outros fatores, além do calor, devem contribuir para a ativação do HSF pelo exercício (FEHRENBACH E NIESS, 1999).

Embora a expressão de HSP seja regulada primariamente em nível transcricional, mecanismos pós-transcricionais também devem ser importantes. O mRNA de HSP70 é relativamente instável sob condições fisiológicas normais e é quase indetectável através de Northern blot em músculos não submetidos a estresse. Assim,

quando o status fisiológico volta ao normal, a quantidade de mRNA de HSP70 viável é diminuída, determinando baixos níveis de transcrição (FEHRENBACH E NIESS, 1999).

1.3 Papel citoprotetor das HSP

Apesar de a indução destas proteínas ter sido inicialmente interpretada como um sinal para a detecção de estresse fisiológico, está bem estabelecido agora que a indução é fundamental nos processos de reparo que seguem diferentes tipos de danos e na prevenção contra a agregação e coagulação de proteínas não-nativas (SANTORO 2000), que é o principal mecanismo através do qual as HSP conferem citoproteção, evitando dobraduras e interações incorretas entre as proteínas. Em condições fisiológicas, os segmentos predominantemente hidrofóbicos das cadeias polipeptídicas que formam as proteínas corretamente dobradas localizam-se no interior da molécula, enquanto os segmentos hidrofílicos voltam-se para o exterior. Esta disposição possibilita a solubilidade das proteínas em meio aquoso e impede a formação de agregados que ocorreriam pela interação das partes hidrofóbicas de diferentes moléculas (MEYER E DA SILVA, 1999).

O papel citoprotetor das HSP e, em particular, das HSP70, tem sido extensivamente documentado tanto *in vitro* como *in vivo*, em uma variedade de doenças humanas incluindo: distúrbios metabólicos, inflamação, infecção e isquemia. No tecido cardíaco, diferentes tipos de agressões, incluindo isquemia miocárdica, trauma e hipertermia, resultam na síntese de HSP, as quais desempenham um papel central no restabelecimento da função cardíaca após injúria, tanto *in vitro* como em modelos

animais. No caso da inflamação, as HSP protegem as células de mamíferos da citotoxicidade mediada pelos TNF¹¹ α e β . Também foi demonstrado que elas suprimem a expressão de iNOS¹² em células da astróglio. Em modelos da síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA) em roedores, o acúmulo induzido de HSP70 nos pulmões está associado com uma diminuição da resposta inflamatória e prevenção da letalidade desta doença. A expressão aumentada de HSP também está associada com a inibição da replicação viral durante infecções agudas (SANTORO 2000).

1.4 NF- κ B e a resposta ao choque térmico

O NF- κ B¹³ é um fator regulador crítico da resposta patogênica imediata e de ativação do sistema imunológico. Ele existe normalmente como um complexo citoplasmático inativo, cuja forma predominante é de um heterodímero composto das subunidades p50 e p65 (*rel A*), ligadas a uma proteína inibitória da família I κ B¹⁴, usualmente a I κ B α . O NF- κ B é ativado em resposta a uma variedade de estímulos patogênicos, incluindo infecção viral e bacteriana, exposição à radiação U.V. ou a citocinas inflamatórias. Sob estimulação, a I κ B α é fosforilada pelo complexo IKK, o qual contém duas subunidades catalíticas (IKK- α e IKK- β) e uma subunidade regulatória IKK- γ , nos sítios que iniciam a ubiquitinação e degradação via proteosoma. A dissociação da I κ B α resulta na translocação do dímero NF- κ B para o núcleo, onde este fator liga a sítios κ B específicos do DNA, induzindo, rapidamente, uma variedade de genes codificando proteínas sinalizadoras. Os genes-alvo incluem os da

¹¹ Tumor necrosis factor

¹² inducible nitric oxide synthase

¹³ Nuclear factor- κ B

¹⁴ Inhibitor of NF- κ B

ciclooxigenase-2, da óxido-nítrico sintase induzível, de diversas citocinas inflamatórias e quimiotáticas, receptores de citocinas, moléculas de adesão celular, assim como genes virais (SANTORO, 2000).

O NF- κ B está envolvido em muitos eventos patológicos, incluindo inflamação e a progressão da AIDS, por aumentar a transcrição do HIV-1. Conseqüentemente, o NF- κ B é um alvo terapêutico atrativo para novas drogas antiinflamatórias e antivirais, e a necessidade de desenvolvimento de inibidores efetivos para o NF- κ B com eficácia terapêutica é amplamente reconhecida. Conhecidos inibidores do NF- κ B incluem inibidores de serino-proteases, fenil-etil-éster do ácido caféico e curcumina, assim como corticosteróides e drogas antiinflamatórias não-esteróides, incluindo aspirina, embora esta aja apenas em concentrações muito elevadas. As prostaglandinas ciclopentenônicas (CPPG) são potentes inibidores da ativação do NF- κ B por citocininas, ésteres phorbol, ou infecção viral, em células humanas. Estes eicosanóides agem inibindo a fosforilação e prevenindo a degradação do I κ B α . A IKK foi recentemente identificada como o alvo molecular para as CPPG, as quais são encontradas ligadas diretamente ao resíduo cisteína na alça de ativação da subunidade IKK β . A inibição depende da presença de um segmento ciclopentenona-reativo, e resulta no bloqueio da transcrição do HIV-1 dependente de NF- κ B, em experimentos de transfecção.

A indução das HSP70 e a inibição dos NF- κ B parecem estar correlacionados e ambos parecem contribuir para a atividade antiviral da CPPG. Tem sido mostrado que a inibição do NF- κ B por prostanóides ciclopentenônicos está sempre associada e temporalmente correlacionada com a ativação dos HSF1. Também, a

inibição do NF- κ B por CPPG pode ser mimetizada por outros indutores da resposta do choque térmico, incluindo indutores químicos, tais como arsenito de sódio, drogas antiinflamatórias não-esteróides, os metais pesados cádmio e zinco, ou por hipertermia. Além disso, uma classe de conhecidos inibidores de NF- κ B, inibidores de serino-proteases, incluindo 3,4-dicloro-isocumarina, induzem a síntese de HSP70 através da ativação do HSF1 e possuem atividade antiviral. Neste caso, além da capacidade destas moléculas de inibirem a ativação do NF- κ B, também estão estreitamente associadas com a ativação do HSF1. Estes resultados indicam que existe uma ligação entre as vias regulatórias destes dois fatores e sugerem a possibilidade de que a ativação do HSF1 poderia tornar as células de mamíferos não responsivas à estimulação por NF- κ B. Se este é o caso, a resposta ao choque térmico poderia regular outros aspectos da resposta celular ao estresse, e a inibição do NF- κ B poderia contribuir para os bem conhecidos efeitos antiinflamatórios e citoprotetores que se seguem a ativação da resposta ao choque térmico em células humanas (SANTORO, 2000).

O mecanismo pelo qual a resposta ao choque térmico interfere com a ativação do NF- κ B não é conhecido. Outras substâncias não relacionadas quimicamente, além das CPPG, e capazes de induzir a resposta ao choque térmico, protegem o I κ B α da degradação induzida por estresse (SANTORO, 2000).

Poderia se supor que, devido a sua ação como chaperona, uma ou mais HSP poderiam ligar tanto nas subunidades de NF- κ B, como a uma das quinases envolvidas na fosforilação da I κ B α , ou à própria I κ B α , bloqueando, assim, sua degradação proteosoma-dependente. Alternativamente, um evento inicial na cascata de sinalização que leve a ativação do HSF1 poderia interferir com a fosforilação do I κ B α ,

implicando na existência de comunicação cruzada entre as quinases envolvidas. Deve ser enfatizado que, ainda que os resultados dos primeiros estudos sugiram esta possibilidade, ainda faltam evidências diretas de que a resposta ao choque térmico esteja ativamente envolvida no controle da NF- κ B, e nós ainda temos pouco entendimento acerca de como diferentes redes de respostas reguladas por estresse interagem umas com as outras (SANTORO, 2000).

A manipulação farmacológica de mecanismos de defesa celulares endógenos, tais como a resposta ao choque térmico, representa uma abordagem inovadora para intervenções terapêuticas nas doenças que causam lesão tecidual (SANTORO, 2000).

1.5 Radicais livres, estresse oxidativo e exercício

A prática diária de exercícios físicos de intensidade moderada é benéfica para a saúde, reduzindo os riscos de diversas desordens relacionadas ao envelhecimento. Por outro lado, exercícios intensos e prolongados têm efeitos adversos sobre a saúde, provavelmente em função da excessiva geração de espécies reativas do oxigênio (RADAK et al. 1999). De fato, o músculo esquelético gera consideráveis quantidades de radicais livres durante contração muscular intensa (CLANTON, ZUO E KLAWITTER, 1999), assim como neutrófilos, eosinófilos e monócitos, em resposta ao exercício vigoroso (NIESS et al. 1999).

Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e, em função disso, apresentam acentuada reatividade

química. Esta característica dá origem ao potente efeito oxidante desses radicais (que facilmente subtraem elétrons de substâncias aceptoras), que é a base para seu efeito destrutivo contra lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e a matriz extracelular. Os mais importantes representantes dos radicais livres são os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}) e óxido nítrico (NO). Vários mecanismos, enzimáticos, envolvendo a catálise por cobre ou ferro, são responsáveis pela geração destes radicais nos sistemas biológicos. Derivados oxidantes secundários podem resultar da reação de um radical livre com outro, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o peroxinitrito ($ONOO^-$) e o ácido hipocloroso (HOCl). Eles também contribuem para o estresse oxidativo devido ao fato de apresentarem maior toxicidade do que os radicais livres originais. Uma distinção terminológica é feita entre as espécies reativas do oxigênio (ROS¹⁵), que incluem os radicais de oxigênio ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet}) e seus derivados (H_2O_2 e o átomo de oxigênio), e as espécies reativas do nitrogênio (RNS¹⁶), tais como o NO e o $ONOO^-$ (NIESS et al., 1999).

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes, o que pode ser consequência de condições como: isquemia-reperfusão, hipoxia severa, estresse térmico severo, choque séptico e lesão induzida por distensão muscular. Essas condições podem levar a injúria e disfunção mecânica (CLANTON ZUO E KLAWITTER, 1999).

Diversos mecanismos são apontados como responsáveis pela produção de radicais livres durante a atividade física. No processo de fosforilação oxidativa mitocondrial, a enzima citocromo oxidase catalisa a redução do oxigênio molecular, o

¹⁵ Reactive Oxygen Species

¹⁶ Reactive Nitrogen Species

que corresponde a 90 a 98% do consumo de O_2 . O oxigênio restante (2 a 10%) sofre redução incompleta, um processo que conduz à geração de superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Assim, a quantidade absoluta de $O_2^{\bullet-}$ deve aumentar como resultado do aumento do consumo de oxigênio pelo músculo em contração (NIESS, et al. 1999).

Outro importante mecanismo de geração de $O_2^{\bullet-}$ é a atividade da xantina oxidase¹⁷, que catalisa a conversão da hipoxantina em xantina, e esta em ácido úrico. Esta enzima age normalmente como desidrogenase, utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) como acceptor de elétrons. Entretanto, condições de proteólise causada por distúrbios na homeostase do cálcio intracelular, estresse térmico e oxidação de grupos tiol determinam sua conversão para a forma oxidase, a qual forma $O_2^{\bullet-}$ durante sua ação catalítica. Tanto em condições de isquemia-reperfusão, como de exercício de alta intensidade, ocorre acúmulo de adenosina monofosfato (AMP) como resultado da ação da adenilato quinase, a fim de compensar a ressíntese inadequada de adenosina trifosfato (ATP). A metabolização subsequente do AMP para inosina monofosfato (IMP) leva a um aumento dos níveis de hipoxantina, a qual é o principal substrato da xantina oxidase. Além disso, a perturbação da homeostase do cálcio celular permite a conversão da xantina desidrogenase para sua forma oxigenase e, portanto, aumenta a quantidade de $O_2^{\bullet-}$ produzido durante e após o exercício (NIESS, et al. 1999).

Um mecanismo adicional de formação de ROS é a conversão de H_2O_2 para o radical muito mais agressivo OH^{\bullet} , via reação de Fenton, na presença de ferro. A extensão da geração de OH^{\bullet} depende principalmente da disponibilidade de ferro livre. O exercício exaustivo parece estar associado a uma liberação aumentada de ferro das

¹⁷ Enzima localizada predominantemente no endotélio vascular

hemo e mioglobinas, ou de seus produtos de degradação, como resultado de danos ao tecido muscular. O cobre, catalisador na reação Haber-Weiss, também deve contribuir para a formação aumentada de OH^\bullet (NIESS, et al. 1999).

Os radicais livres podem agir como sinalizadores em diversos tipos de células (JACKSON, 1999; CLANTON, ZUO E KLAWITTER,1999) e o conhecimento dos mecanismos através dos quais eles influenciam a expressão gênica é de importância particular nos tecidos que, como o músculo esquelético, são sistematicamente expostos a uma quantidade variável de estresse oxidativo (JACKSON, 1999). Especula-se que os radicais livres, através da indução de fatores de transcrição sensíveis ao estado redox da célula, como o NF- κ B e a AP-1¹⁸, tenham importante papel na efetivação das adaptações ao treinamento físico. Corrobora com esta idéia o fato de que a geração intracelular de ROS, por estímulos patogênicos ou inflamatórios, resulta na inativação da subunidade inibitória I- κ B do NF- κ B, permitindo que este ligue às seqüências reguladoras da expressão de genes-alvo. No entanto, o papel, no exercício, da ativação do NF- κ B e do AP-1, pelas ROS, é pouco conhecido (NIESS et al. 1999).

Antagonizando os efeitos das ROS, os sistemas de proteção antioxidantes do corpo, assim como os antioxidantes alimentares, modulam diversos processos de sinalização sensíveis ao estado redox da célula. Esses sistemas, que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSPx), heme oxigenase-1 (HO-1) e outras proteínas de choque térmico (HSP), podem ser influenciados tanto pelo esforço físico agudo como pelo treinamento (NIESS et al. 1999).

¹⁸ Activator protein-1

Os antioxidantes da dieta, como o α -tocoferol e o ácido ascórbico, podem exercer efeitos moduladores sobre o sistema imunológico, suprimindo a produção de várias citocinas inflamatórias e também da inibindo a expressão de iNOS nos macrófagos. No entanto, o efeito protetor destas manipulações sobre os danos musculares induzidos pelo exercício não é claro. Outro aspecto que também merece consideração no que diz respeito ao uso de antioxidantes dietéticos é que não se pode excluir a possibilidade de que, em grandes doses, eles possam ser contra-produtivos para o processo de regeneração do músculo. Desta forma, é preciso considerar a necessidade de manutenção de níveis ótimos de α -tocoferol e ácido ascórbico (NIESS et al. 1999).

A influência de exercícios agudos e crônicos sobre a atividade da SOD, CAT e GSPx foi investigada em vários tecidos. A SOD, uma metaloproteína localizada primariamente no citoplasma e mitocôndrias de células de mamíferos, catalisa a conversão (dismutação) de superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. A CAT remove o H_2O_2 pela conversão deste em água e oxigênio. A GSPx é uma enzima que catalisa a redução de H_2O_2 e peróxidos de ácidos graxos em água e dissulfeto de glutathione (também conhecida como glutathione oxidada, GSSG), utilizando GSH como doador de elétrons. A GSSG é regenerada a GSH numa reação em que o NADPH é o agente redutor. Resumidamente, o exercício vigoroso agudo aumenta a atividade da SOD no músculo esquelético, coração, pulmão, fígado e células sanguíneas vermelhas. Embora tenham sido detectados efeitos estimulantes do exercício sobre a GSPx, a influência do exercício agudo sobre a esta enzima ainda é inconsistente. O treinamento físico, por sua vez, parece induzir a atividade da GSPx e da SOD,

embora não tenham sido demonstrados efeitos deste tipo de intervenção, sobre a atividade da CAT. Em leucócitos humanos, até o presente, não há dados disponíveis sobre mudanças na atividade de SOD, CAT ou GSPx, relativas ao exercício (NIESS et al. 1999).

A heme-oxigenase possui duas isoformas: a HO-1 (32 kDa), que é induzível, e a HO-2 (32 kDa), que é constitutiva. A elevação da expressão de HO-1 protege a célula contra o estresse oxidativo reduzindo o pool intracelular de ferro livre, via indução da síntese de ferritina, se opondo à geração de ROS através da reação de Fenton. Além disso, a HO-1 catalisa a etapa inicial na degradação de heme a bilirrubina, um potente antioxidante hidrossolúvel. Aumentos na expressão de HO-1, em função de exercício, foram demonstrados em músculos de camundongos, monócitos, linfócitos e granulócitos humanos. Além disso também foi observado que a expressão basal de HO-1 em leucócitos foi menor em indivíduos treinados do que em não treinados, indicando um estado pró-oxidante mais baixo nas células, devido a adaptações ao treinamento físico (NIESS et al. 1999).

A HSP70 também parece proteger contra o estresse oxidativo. No entanto, apenas a geração intracelular, e não a exposição extracelular às ROS, aumentam as HSP70 citoplasmáticas. Com relação aos efeitos protetores da HO-1 e da HSP70, a expressão aumentada dessas proteínas de estresse devem ajudar a manter a viabilidade, função e capacidade proliferativa de células imuno-competentes, durante e após o exercício vigoroso (NIESS et al. 1999).

O envolvimento do NF- κ B na expressão de citocinas inflamatórias e, conseqüentemente, de seus efeitos moduladores sobre os processos inflamatórios agudos e crônicos, é importante do ponto de vista fisiopatológico. Discute-se o papel dos antioxidantes como opção terapêutica, devido a um efeito inibitório do NF- κ B, o qual têm sido observado, quando se administra ácido ascórbico e outros antioxidantes (NIESS et al. 1999).

O aprimoramento das defesas antioxidantes em resposta ao condicionamento muscular também sugere uma estreita relação entre as espécies reativas de oxigênio e a atividade contrátil (NIESS et al. 1999).

1.6 NO, HSP e proteção contra injúria tecidual

O óxido nítrico é um radical livre gasoso, pequeno e relativamente estável que prontamente se difunde nas células, onde reage com alvos moleculares. Apesar de servir como uma molécula sinalizadora-chave em diversos processos fisiológicos (e.g. defesa imunológica, comunicação neural e regulação vascular), pode causar ou contribuir para condições fisiopatológicas (e.g. choque vascular, diabetes, neurodegeneração, artrite e inflamação crônica) quando sua síntese é desregulada e excessiva (GROSS et al. 1995).

Em mamíferos, como resultado de seus efeitos antimicrobianos, o NO e outros RNS estão envolvidos na defesa do organismo (“host defense”). A geração de óxido nítrico, a partir de arginina, é catalisada pela óxido nítrico sintase induzível

(iNOS¹⁹), sendo esta enzima expressa em monócitos, macrófagos, linfócitos T, neutrófilos, eosinófilos e células mesangiais do sistema imunológico humano. Níveis normais de NO também são necessários para vários outros mecanismos fisiológicos, incluindo as funções de sinalização, mas sua produção excessiva pode ter efeitos prejudiciais para as células. No metabolismo energético, os complexos efeitos do NO incluem a inibição da NADH-ubiquinona e da succinato-ubiquinona-oxi-redutase, na cadeia respiratória mitocondrial, e da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, na glicólise (NIESS et al. 1999).

Uma ampla variedade de fatores, ativadores e inibidores, foram identificados como moduladores da expressão de iNOS, através dos quais, várias citocinas desempenham seu papel. A expressão de iNOS, *in vitro*, pode ser estimulada pela combinação de IFN- γ , TNF- α e IL- β . IL-8 e IL-6 têm um efeito mais inibitório, o qual pode ser entendido como um importante mecanismo de feedback na regulação da iNOS (NIESS et al. 1999).

A influência do exercício físico sobre a expressão de iNOS e produção de NO em células imunocompetentes ainda é pouco conhecido. Foi demonstrado que a corrida exaustiva em esteira em uma intensidade de 110% do limiar anaeróbio individual (IAT), em homens não treinados, resultou em aumento na expressão de iNOS em neutrófilos e linfócitos, o qual persistiu por 48 h após o exercício. Uma expressão aumentada de iNOS também foi observada imediatamente após uma corrida de meia-maratona. Uma vez que o NO não foi determinado nesses estudos, não se sabe se a expressão aumentada de iNOS se traduz em um aumento relevante na geração de NO pelos leucócitos. Além disso, o exato mecanismo levando a um aumento na expressão

¹⁹ inducible NO-synthase

de iNOS, em função do exercício, não está claro. Fatores que produzem uma liberação aumentada de citocinas, como IFN- γ , TNF- α ou IL-1 β , sob estresse físico, podem estar envolvidos na produção aumentada de NO (NIESS et al. 1999) e precisam, portanto, ser investigados.

Segundo Veseley et al. (1998), no tecido muscular esquelético, a HO-1 parece ser induzida apenas por exercício ou estimulação elétrica *in vivo*. Estes autores, estudando os efeitos da hemina e do nitroprussiato de sódio em células da linhagem de mioblastos esqueléticos de rato L6G8, observaram um aumento tempo e dose-dependente na atividade de HO-1. O efeito do nitroprussiato de sódio, por sua vez, era reduzido pela co-incubação com hidroxí-cobalamina, sugerindo que o NO deve estar envolvido na ativação do gene que codifica para HO-1.

A adenosina e o óxido nítrico, substâncias vasoativas candidatas para a regulação local do fluxo de sangue no músculo esquelético, aumentam nas células musculares e no fluido intersticial durante o exercício. Além disso, as enzimas responsáveis pela formação destas duas substâncias, AMP 5'-nucleotidase e a NOS, também estão ativas durante a contração muscular. Evidências *in vivo*, como *in vitro*, sugerem que o aumento na concentração intersticial de adenosina, induzido por contração, resulta da síntese extracelular mediada pela AMP 5'-nucleotidase extracelular ligada à membrana. Ainda não está claro se a indução da formação de óxido nítrico no músculo se origina da NOS endotelial, localizada no endotélio microvascular, ou da NOS neuronal (nNOS) das células neurais e fibras musculares. Evidências funcionais do papel da adenosina no controle do fluxo sanguíneo muscular se apóiam em estudos utilizando agonistas e antagonistas do receptor de adenosina, adenosina

deaminase ou inibidores da captação de adenosina. A maioria destes estudos foi realizada em animais de laboratório e, ainda que estes resultados mostrem alguma discrepância a maioria indica que a adenosina participa na regulação do fluxo sanguíneo muscular. Em humanos, ainda faltam evidências que confirmem este papel da adenosina. O papel do NO na regulação do músculo esquelético têm sido estudada com inibidores de NOS. Apesar do grande número de estudos nesta área, o papel do NO no aumento do fluxo de sangue muscular induzido por contração ainda é incerto. A maioria dos estudos, mas não todos, em humanos e animais mostraram que, embora o bloqueio da NOS reduza o fluxo sanguíneo muscular no repouso, e durante a recuperação do exercício, não há nenhum efeito deste bloqueio sobre o aumento da perfusão muscular durante o exercício. Ainda não existem evidências conclusivas sobre os mecanismos subjacentes ao aumento multi-fase do fluxo sanguíneo muscular durante o exercício, assim como sobre o papel e potência das diversas substâncias vasoativas (RADEGRAN E HELLSTEN, 2000).

O exercício também provoca estresse oxidativo através da geração aumentada de intermediários reativos do oxigênio (ROI²⁰) no músculo, assim como no sistema hematopoiético. A elevação de temperatura induzida pelo exercício também deve provocar o estresse oxidativo, uma vez que Salo observou que, com o aumento da temperatura, as mitocôndrias musculares sofriam um progressivo desacoplamento com geração aumentada de ROI (SALO et al., 1991).

Um papel para os intermediários reativos do oxigênio, produzidos primariamente como consequência do elevado ritmo de respiração mitocondrial é

²⁰ Reactive oxygen intermediates

postulado na fadiga muscular. Considerando a capacidade potencial dos intermediários reativos do oxigênio de danificarem as proteínas intracelulares durante séries consecutivas de contrações musculares, a capacidade de rotas antioxidantes pré-existentes pode ser complementada pela síntese de HSP. Aumentos no mRNA de HO-1, em particular, devem fazer parte de uma rota antioxidante induzível no músculo esquelético que é responsiva ao estresse metabólico associado com contrações musculares repetidas (FEHRENBACH E NIESS, 1999).

A ativação de neutrófilos descritas após exercício e um aumento dos produtos de peroxidação lipídica sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel importante nas mudanças induzidas pelo exercício nas células hematopoiéticas. Em particular, a proteína HO-1 antioxidante é induzida por hipóxia e estresse oxidativo. Uma rota redox-sensível faz a mediação de pelo menos parte da indução do gene de HO-1 por hipóxia em miócitos cardíacos. Foi observado que a indução de HO-1 em leucócitos após exercício de endurance extenuante de longa duração se correlaciona com a concentração plasmática aumentada de interleucina-8, um indicador da ocorrência de intermediários reativos de oxigênio *in vivo*. Estes resultados permitem considerar o estresse oxidativo como um estímulo potencial para a expressão de HSP associada ao exercício (FEHRENBACH E NIESS, 1999).

Segundo SALO et al. (1991) a hipertermia do exercício provocaria o desacoplamento mitocondrial, elevando a concentração de ubisemiquinone e aumentando a concentração de superóxido (O_2^-). O superóxido e o subsequentemente formado peróxido de hidrogênio (H_2O_2) devem ser responsáveis pela expressão aumentada de HSP70 e de outras HSP.

1.7 Exercício, expressão de HSP, sistema imune e citocinas

Diferentes tipos de exercícios resultam em resposta imune aguda e na ativação de células imuno-competentes. Foram demonstrados aumentos, induzidos pelo exercício, nas concentrações de IL-1, IL-6 e IL-8, TNF α e IFN- γ . Uma vez que várias citocinas foram descritas como reguladoras positivas da expressão de HSP, é possível que elas estejam envolvidas no aumento de síntese destas proteínas durante o exercício. Em leucócitos humanos, após exercício extenuante de resistência, foram encontrados aumentos paralelos em várias HSP, de um lado, e TNF α , IL-6 e IL-8, de outro, sugerindo o envolvimento das citocinas na regulação da expressão das HSP (FEHRENBACH E NIESS, 1999). Uma maior percentagem de leucócitos expressando HSP27, HSP60 e HSP70 foram observados imediatamente após uma corrida de meia maratona, a fim de manter a função destas células após exercício intenso. A expressão de HSP foi acompanhada por aumentos significativos na contagem de leucócitos, creatina quinase (CK), mieloperoxidase, ácido úrico e citocinas (FEHRENBACH E NIESS, 1999; FEHRENBACH et al., 2000). Também foi observado que os valores percentuais de atletas treinados, em repouso, eram significativamente mais baixos que os de indivíduos não treinados, o que parece ser o resultado de mecanismos de adaptação ao treinamento regular (FEHRENBACH et al., 2000). Em ratos, a corrida em esteira sem estresse muscular e/ou o exercício em baixas temperaturas, resultando em uma temperatura retal menor que 40 °C produziu apenas um pequeno aumento de HSP70 em leucócitos. Além disso, estresse muscular ou exercício extenuante breve sozinhos não foram suficientes para estimular a expressão de HO-1 em leucócitos humanos (FEHRENBACH E NIESS, 1999).

1.8 Músculo esquelético, exercício e expressão de HSP

Células submetidas a estresse podem sobreviver ou morrer dependendo do tipo de célula, do tipo e intensidade do estresse e de outros fatores. A exposição prévia das células a condições estressantes não-letais pode suscitar a síntese de HSP e proteger contra os efeitos lesivos de novas exposições (MEYER E DA SILVA, 1999). O exercício físico de duração e intensidade adequadas é um estresse capaz de perturbar a homeostasia celular e proporcionar estímulos como elevação de temperatura, diminuição de pH, aumento da concentração de íons cálcio e diminuição da disponibilidade de oxigênio (COYLE et al., 2000), assim como a redução das reservas de glicogênio (FEHRENBACH E NIESS, 1999). Essas condições são bastante semelhantes àquelas capazes de ativar o HSF e promover a síntese de HSP (LOCKE E NOBLE, 1995; FEHRENBACH E NIESS, 1999). Na verdade, vários autores afirmam que o exercício é um estímulo adequado para promover aumentos na expressão de proteínas de estresse (LOCKE E NOBLE, 1995; ESSIG E NOSEK, 1997; FEHRENBACH E NIESS, 1999). Em consonância com esta afirmação está a observação de que o ritmo de síntese de HSP70 aumenta, tanto no sóleo como no extensor longo dos dedos, após uma única sessão de exercício (HERNANDO E MANSO, 1997). Também foram observados níveis aumentados de mRNA codificando para HSP70, em função do exercício, choque térmico e estresse oxidativo, em músculo cardíaco e esquelético (FEHRENBACH E NIESS, 1999).

Algumas HSP são sintetizadas com o aumento da duração do exercício, enquanto outras são sintetizadas apenas em condições de exaustão ou próximo a ela (LOCKE E NOBLE, 1995). Febbraio e Koukoulas (2000) examinaram o efeito do

exercício até a exaustão sobre a expressão do mRNA codificando para HSP70 em cinco homens saudáveis que pedalarão até a exaustão numa intensidade de 63% da captação máxima de oxigênio. Foram obtidas amostras do músculo vasto lateral e medida a temperatura muscular em repouso, aos 10 min de exercício, aproximadamente 40 min antes da fadiga (144 ± 7 min) e no momento em que ocorreu a fadiga (186 ± 15 min). A temperatura muscular aumentou inicialmente (10 min) e então se manteve estável até o final do exercício. A concentração de lactato também aumentou inicialmente (10 min), mas não era diferente dos valores de repouso 40 min antes e no momento em que ocorreu a fadiga. O conteúdo de glicogênio muscular, por sua vez, diminuiu progressivamente ao longo do exercício, passando de 486 ± 74 mmol/kg de peso seco no repouso para 25 ± 7 mmol/kg de peso seco no momento da fadiga. A concentração de mRNA HSP70 aumentou $2,2 \pm 0,5$ vezes 40 min antes do momento de fadiga e $2,6 \pm 0,9$ vezes no momento da fadiga, mas não era diferente dos valores de repouso aos 10 min de exercício. Assim, os dados sugerem um aumento progressivo no conteúdo de mRNA codificando para HSP70, indicando que o exercício agudo é capaz de desencadear a resposta de estresse.

O exercício físico é capaz de elevar a temperatura central até 44 °C e a muscular acima de 45 °C (SALO et al.1991). Esse aumento de temperatura parece ser fundamental na expressão das HSP, uma vez que Hammond não conseguiu demonstrar aumento na concentração de HSP70 após uma hora de natação (HAMMOND et al., 1982). Segundo Fehrenbach E Niess, a submersão em água, neste experimento, poderia ter amenizado a elevação da temperatura corporal. No entanto, outros fatores como a proporção de fibras do tipo I nos grupos musculares envolvidos nesse estudo (LOCKE E NOBLE, 1995), ou que a intensidade de exercício utilizada (NOBLE et al., 1999) também podem ter influenciado os resultados.

O aumento coincidente na concentração de catecolaminas e na síntese de HSP70, levou Paroo e Noble (1999) a estudarem o papel dos receptores beta-adrenérgicos na expressão dessas proteínas. Os resultados obtidos levaram os autores a concluir que o receptor beta-adrenérgico não induz a síntese de HSP70, per se, mas deve estar envolvido na complexa regulação da resposta de estresse ao exercício.

Uma das teorias para explicar a fadiga de baixa frequência (LFF²¹) aponta a interrupção de algum estágio no processo de acoplamento excitação-contração em decorrência da desnaturação, por espécies reativas do oxigênio (ROS²²), de uma ou mais proteínas associadas com o mecanismo de liberação do Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático. Dado o potencial das ROS danificarem proteínas intracelulares durante séries subsequentes de contrações musculares, a capacidade dos sistemas antioxidantes pré-existentes deve ser complementada pela síntese de HSP induzíveis (ESSIG E NOSEK, 1997). A quantidade de mRNA para HO-1, importante proteína de estresse oxidativo, aumenta no músculo após repetidas contrações. A ocorrência deste aumento depende da geração ativa de tensão, não ocorrendo no caso da geração de tensão por processos passivos. Aumentos na expressão de mRNA codificando para HO-1 deve fazer parte de um sistema antioxidante induzível pelo estresse metabólico resultante de contrações musculares repetidas. A análise por Northern blot mostrou também que o mRNA codificando para HSP70 estava 3,5 a 15,5 vezes maior do que os valores de controle (ESSIG et al. 1997).

²¹ low-frequency fatigue

²² reactive oxygen species

A possibilidade das mitocôndrias de músculo cardíaco serem fonte de estresse oxidativo, *in vivo*, foi confirmada por Leeuwenburgh et al. (1999) pela observação de que o exercício determina um aumento de 50% na ocorrência de orto-tirosina, meta-tirosina e o,o'-ditirosina nas proteínas mitocondriais. Segundo os autores, estes marcadores aumentam em proteínas oxidadas por radical hidroxila, de modo que os resultados obtidos proporcionam evidência direta de que as mitocôndrias do músculo cardíaco produzem um intermediário semelhante ao radical hidroxila (LEEUVENBURGH et al. 1999).

Exercícios de intensidades não habituais e extenuantes podem causar dano ao músculo esquelético, especialmente se envolverem contrações excêntricas.²³, o que pode ser constatado, segundo Clarkson e Sayers (1999), diretamente em nível celular (diminuição da quantidade e da atividade de proteínas transportadoras de glicose e lactato/H⁺), ou indiretamente a partir de vários índices da função muscular (menor capacidade de alongamento e de gerar tensão). O estresse fisiológico associado com dano muscular resulta em resistência sistêmica à ação da insulina. Os mecanismos moleculares associados a esta resistência, segundo Del Aguila, et al.(2000), envolvem a menor ativação do IRS-1²⁴, da fosfatidil-inositol 3-quinase e da proteína quinase B, o que leva, presumivelmente, a uma menor captação de glicose mediada pela insulina. Uma vez que a produção de TNF α se correlaciona ($r = 0,77$, $P < 0,05$) com a menor ação da insulina sobre a PI 3-quinase, é possível que este fator seja responsável pela diminuição da transdução do sinal da insulina (DEL AGUILA et al. 2000). Esta maior resistência à insulina poderia levar a expressão aumentada de GRP75 e GRP78.

²³ Contrações em que o músculo se alonga apesar de estar desenvolvendo tensão.

²⁴ insulin receptor substrate-1

A atividade física prolongada também pode determinar maior expressão de GRP75 e GRP78, na medida em que leva à progressiva depleção de glicose e das reservas de glicogênio muscular, fenômeno que se correlaciona fortemente com fadiga (ESSIG E NOSEK, 1997).

O exercício promove a síntese de HSP por diversos mecanismos, porém é mais provável que exista um mecanismo comum entre os vários agentes estressores relacionados ao exercício. Além disso, deve ocorrer regulação diferencial tanto em nível de mRNA como em nível de proteínas (FEHRENBACH E NIESS, 1999).

1.9 Músculo esquelético, treinamento físico e expressão de HSP

Considerando os benefícios da expressão de HSP pelas células ou tecidos, é importante perguntar que efeito teria o exercício físico sistemático sobre a expressão de HSP?

Embora existam informações limitadas sobre o assunto, o exercício físico regular (treinamento) parece aumentar o conteúdo de HSP70 no músculo esquelético de ratos. A extensão dos efeitos obtidos parece depender dos grupos musculares envolvidos e do tipo de exercício empregado (LOCKE E NOBLE, 1995).

O conteúdo muscular de HSP70, em ratos, está relacionado com a proporção de fibras que contém meromiosina pesada (MHC²⁵) do tipo I, uma vez que a HSP70 é expressa constitutivamente neste tipo de fibra muscular. Assim, músculos como o sóleo, composto primariamente por fibras do tipo I, apresentam um elevado conteúdo de HSP70, parecendo estar em um estado de choque térmico contínuo. Em contraste, músculos como o gastrocnêmio, composto primariamente por fibras do tipo IIb, apresentam um baixo conteúdo de HSP70 (LOCKE E NOBLE, 1995). O extensor longo dos dedos também apresenta uma expressão constitutiva de HSP70 menor que o sóleo, enquanto a expressão de HSP73 é semelhante (HERNANDO E MANSO 1997). O aumento proporcional de MHC do tipo I e de HSP que acompanha a hipertrofia muscular compensatória do músculo plantar está de acordo com a idéia de que este tipo de MHC está associado à expressão de proteínas de choque térmico (LOCKE E NOBLE, 1995).

O treinamento de endurance, em ratos, aumenta a expressão basal de HSP70, HSP73 e HSP60 nos ventrículos e no músculo sóleo, mas não nos átrios e na porção lateral do gastrocnêmio (SAMELMAN, 2000). No entanto, Gonzalez et al. (2000) afirma que a “up-regulation” de HSP70 em resposta ao exercício regular depende da manutenção deste e que uma alça de retroalimentação deve restabelecer o limiar, característico das fibras não submetidas a estresse, quando o treinamento é interrompido.

²⁵ myosin heavy chain

2 OBJETIVOS

Conforme discutido acima, HSP são induzidas pelo exercício e fazem citoproteção. Entretanto o mecanismo de indução pelo exercício não está esclarecido. Por esta razão, neste trabalho propusemos investigar os seguintes aspectos da indução de HSP relacionada ao exercício físico:

2.1 Objetivo Geral

Verificar a existência de uma correlação entre a produção de óxido nítrico pelo músculo esquelético e a indução da síntese de HSP70 pela fibra muscular esquelética.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a intensidade do exercício através da concentração de lactato no plasma e do conteúdo de glicogênio no músculo.
- Avaliar a expressão da HSP70 no músculo em resposta ao exercício.
- Avaliar o estado redox do tecido muscular através do metabolismo da glutathiona.

- Avaliar a lipoperoxidação no músculo através da medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS
- Avaliar a relação entre a produção de NO e a expressão de HSP70 no músculo, em resposta ao exercício, através do uso do bloqueador da NO sintase L-NAME.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 57 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) adultos (3-4 meses) machos (figura 01).



Figura 1 - Animais

A opção por animais machos, entre outros fatos, se deveu ao de que o estrogênio, segundo Paroo et al. (1999), determina uma menor expressão de HSP70 em resposta ao exercício. Os animais, obtidos junto ao Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS, foram mantidos sob um ciclo de claro/escuro de 12/12 h e temperatura ambiente de 23 °C. Receberam, *ad libitum*, dieta comercial-padrão para ratos de laboratório contendo aproximadamente 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lípidos, e tiveram livre acesso a água. Os procedimentos experimentais bem como a eutanásia dos animais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFRGS.

3.2 Exercício

O protocolo de exercício compreendeu uma sessão única de uma hora de natação em caixas plásticas (400 mm de altura, 362 mm de comprimento e 270 mm de largura) com capacidade para 20 litros, contendo água a uma temperatura entre 31 ± 1 °C (figura 02). Esta temperatura foi escolhida por ser considerada neutra para o animal (HARRI E KUUSELA, 1986) e evitando, assim, que a imersão em água fria amenizasse a elevação da temperatura que acompanha o exercício ou que o estresse térmico pudesse interferir nos resultados, caso a temperatura da água fosse elevada acima do valor escolhido, conforme já verificado em outros estudos (FEHRENBACH E NIESS, 1999). Para impedir que os animais flutuassem foi fixado, à cauda²⁶, um peso correspondente a 5% do peso corporal deste (figura 03) (GOBATTO et al., 2001).

²⁶ Com exceção do grupo em que foi feita a determinação da concentração plasmática de lactato, nos quais o peso foi fixado ao tronco, tendo sido tomado cuidado de que isto não limitasse os movimentos do animal

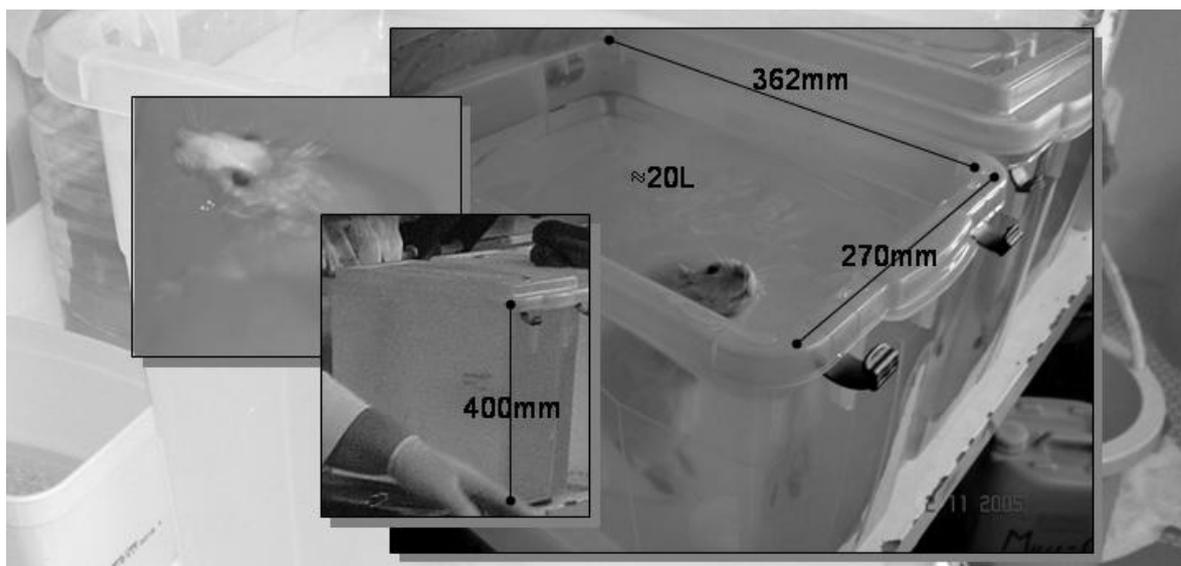


Figura 2 - Tanques para natação

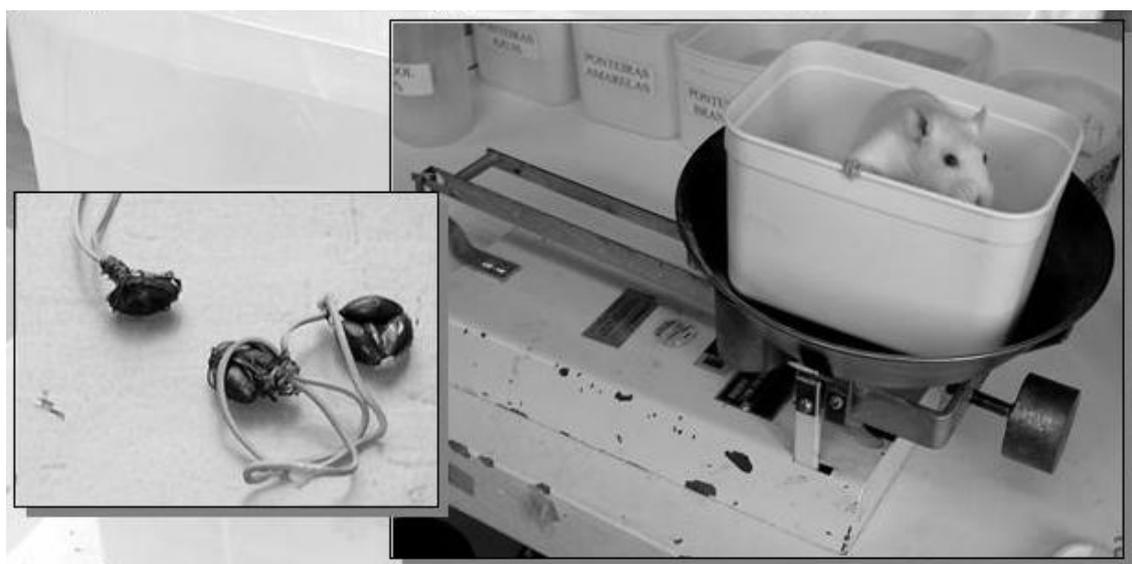


Figura 3 - Pesagem dos animais e seleção do lastro

Os animais foram considerados fatigados quando não conseguiam acompanhar as bolhas de ar que liberavam, quando submersos, até a superfície ou quando se apresentavam desorientados. Quando a fadiga sobrevinha antes que fossem

completados, pelo menos, 55 minutos de natação, o animal não era utilizado no estudo. No entanto, a maioria dos animais não chegou à condição de exaustão.

3.3 Delineamento experimental

Os grupos experimentais foram constituídos de acordo com os objetivos específicos estabelecidos:

3.3.1 Experimentos para avaliar o esforço dos animais submetidos ao exercício

A intensidade do exercício foi avaliada através da determinação da concentração plasmática de lactato e do conteúdo de glicogênio no músculo gastrocnêmio.

Para avaliar a alteração na concentração plasmática de lactato em resposta ao exercício foram utilizados três animais, tendo sido feita uma medida da concentração de lactato imediatamente **antes** e outra imediatamente **após** o exercício.

Para avaliar a variação no conteúdo muscular de glicogênio foram formados dois grupos: (1) **controle** (n=3), no qual os animais foram colocados, por uma hora, em caixas plásticas contendo um volume de água a 31 ± 1 °C suficiente para cobrir parte do corpo do animal; (2) **exercício** (n=3), cujos animais foram colocados para nadar, por uma hora, em caixas plásticas contendo água a 31 ± 1 °C, tendo uma sobrecarga de 5 % do peso corporal total fixado ao corpo.

3.3.2 Avaliação do estado redox no músculo gastrocnêmio

O estado redox, avaliado através do metabolismo da glutathiona, envolveu a constituição de dois grupos: (1) **controle** (n=6), no qual os animais foram colocados nas mesmas condições descritas para o grupo controle no item anterior ; (2) **exercício** (n=6), cujos animais foram colocados para nadar, também nas mesmas condições descritas para o grupo exercício no item anterior.

3.3.3 Avaliação da lipoperoxidação através da medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS

A avaliação do grau de lipoperoxidação foi efetivada através da constituição de dois grupos, como descrito no item anterior: (1) **controle** (n=6) e (2) **exercício** (n=6).

3.3.4 Avaliação da produção de NO através da estimativa da concentração de nitratos e nitritos no músculo gastrocnêmio

A concentração de nitritos e nitratos foi determinada nos músculos gastrocnêmio e sóleo em quatro grupos: (1) **controle salina** (n=6), no qual os animais receberam uma injeção de salina i.p. 20 min antes de serem colocados, por uma hora, nas caixas plásticas contendo um volume de água a 31 ± 1 °C suficiente para cobrir parte do corpo do animal; (2) **exercício salina** (n=6), cujos animais receberam uma injeção de salina i.p. 20 min antes de serem colocados para nadar com uma sobrecarga correspondente a 5 % do peso corporal, por uma hora, em água a mesma temperatura do

grupo controle salina; (3) **controle L-NAME** (n=6), no qual os animais receberam uma injeção i.p. de L-NAME (300 mg/kg; GAVIN et al, 2000) 20 min antes de serem colocados, também por uma hora, nas mesmas condições do grupo controle salina; (2) **exercício L-NAME** (n=6), cujos animais igualmente receberam uma injeção i.p. de L-NAME (300 mg/kg) antes de serem colocados para nadar nas mesmas condições do grupo exercício controle.

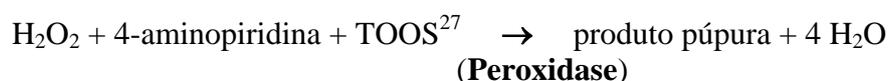
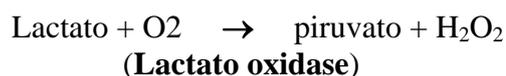
3.3.5 Avaliação da expressão de HSP70 em resposta ao exercício e da correlação entre a produção de NO e a expressão de HSP70 nos músculos gastrocnêmio e sóleo

A expressão de HSP70 e sua relação com a produção de NO também foi avaliada em quatro grupos de animais: (1) **controle salina** (n=3), no qual, como descrito no item anterior, os animais receberam uma injeção de salina i.p. 20 min antes de serem colocados, por uma hora, nas caixas plásticas contendo um volume de água a 31 ± 1 °C suficiente para cobrir parte do corpo do animal; (2) **exercício salina** (n=3), cujos animais, da mesma forma como descrito para o item anterior, receberam uma injeção de salina i.p. 20 min antes de serem colocados para nadar com uma sobrecarga correspondente a 5 % do peso corporal, por uma hora, em água a mesma temperatura do grupo controle salina; (3) **controle L-NAME** (n=3), no qual os animais receberam uma injeção i.p. de L-NAME (300 mg/kg) 20 min antes de serem colocados, também por uma hora, nas mesmas condições do grupo controle salina; (2) **exercício L-NAME** (n=3), cujos animais igualmente receberam uma injeção i.p. de L-NAME (300 mg/kg) antes de serem submetidos a natação nas mesmas condições do grupo exercício controle.

3.4 Determinação do conteúdo de lactato no plasma

Os procedimentos para obtenção e preparação das amostras de sangue para determinação do conteúdo plasmático de lactato foram os mesmos descritos por Gobatto et al. (2001). As amostras de sangue (25 μ L) foram obtidas a partir de uma pequena incisão feita com bisturi na ponta da cauda imediatamente antes e logo após o exercício e coletadas em tubos Eppendorf[®] (1,5 mL). Antes da coleta, 50 μ L de fluoreto de sódio 1 % (m/v) eram depositados no Eppendorf[®] que, por ser hipotônico, provoca a hemólise e também a inibição da enzima glicolítica enolase, interrompendo assim a atividade glicolítica, contribuindo também para evitar a coagulação sangüínea. Para evitar que o sangue fosse diluído pela água residual na cauda (após a natação), os animais foram rapidamente secados com uma toalha imediatamente antes da coleta. A amostra foi, então, centrifugada por 10 min a 1000 g e o sobrenadante retirado e mantido a -20°C até o momento de determinação da concentração de lactato.

Para a determinação da concentração de lactato utilizou-se o kit LC 2389, Randox Laboratories Ltd, e seguiu-se as orientações do fabricante. Basicamente, a determinação é feita por método colorimétrico envolvendo o seguinte conjunto de reações:



²⁷ TOOS = N-ethyl-N-(2 hidroxí-3-sulfopropil) m-toluidina

O volume de 10 μL de amostra ou do padrão (também em triplicata) foi incubado com 1000 μL de reagente enzimático (mistura contendo 0,4 mmol/L de 4-aminopiridina, ≥ 1000 U/I de peroxidase, ≥ 600 U/I de lactato oxidase e ≥ 10000 U/I de ascorbato oxidase), em triplicata, à temperatura ambiente (20 – 25 °C) por 10 min. Como branco, foi utilizado apenas o volume de 1000 μL do reagente. A leitura da absorbância foi feita na faixa de 550 nm e a concentração de lactato nas amostras calculada pela seguinte fórmula:

$$[\text{La}] = \frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do padrão}} \times \text{concentração do padrão}$$

(mmol/L)

$$[\text{La}] \text{ do padrão} = 4,44 \text{ mmol/L}$$

Os resultados encontrados (média \pm desvio padrão) foram plotados em um histograma.

3.5 Obtenção e processamento de tecido muscular (gastrocnêmio e sóleo)

Os animais, após o exercício foram secos (com toalha e secador de cabelos) e imediatamente sacrificados por decapitação. Este método é extremamente rápido e eficaz, levando a perda imediata do reflexo palpebral, além de produzir mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos (ANDERSEN et al., 2004). Após o sacrifício, os animais foram fixados em uma mesa de parafina e foi feita uma incisão longitudinal na face posterior da pata traseira do animal, iniciando próximo ao calcanhar. A incisão seguiu no sentido caudal-rostral o suficiente para expor o músculo gastrocnêmio. A seguir os tendões deste músculo e do sóleo foram seccionados próximos a suas inserções no túber calcâneo e os dois músculos suspensos pelo tendão.

Procedeu-se a retirada do sóleo através da secção do seu tendão proximal, próximo a sua inserção na cabeça da fíbula (figura 04). O músculo foi então passado a um segundo experimentador que imediatamente congelava-o por esmagamento com um alicate contendo duas placas de alumínio mantidas em gelo seco (figura 5, quadro 2). Enquanto este segundo experimentador pesava o músculo e o envolvia em papel laminado previamente identificado e armazenava-o no freezer, o primeiro procedia à retirada do gastrocnêmio. As duas porções, lateral e medial, foram separadas de suas inserções nos epicôndilos lateral e medial do fêmur por uma seção próximo a estas. A porção branca do gastrocnêmio foi separada da vermelha com auxílio da tesoura e pinça e as porções (branca e vermelha) foram passadas ao segundo experimentador que procedeu da mesma forma como antes. Os músculos foram armazenados em freezer -70°C para posterior processamento.

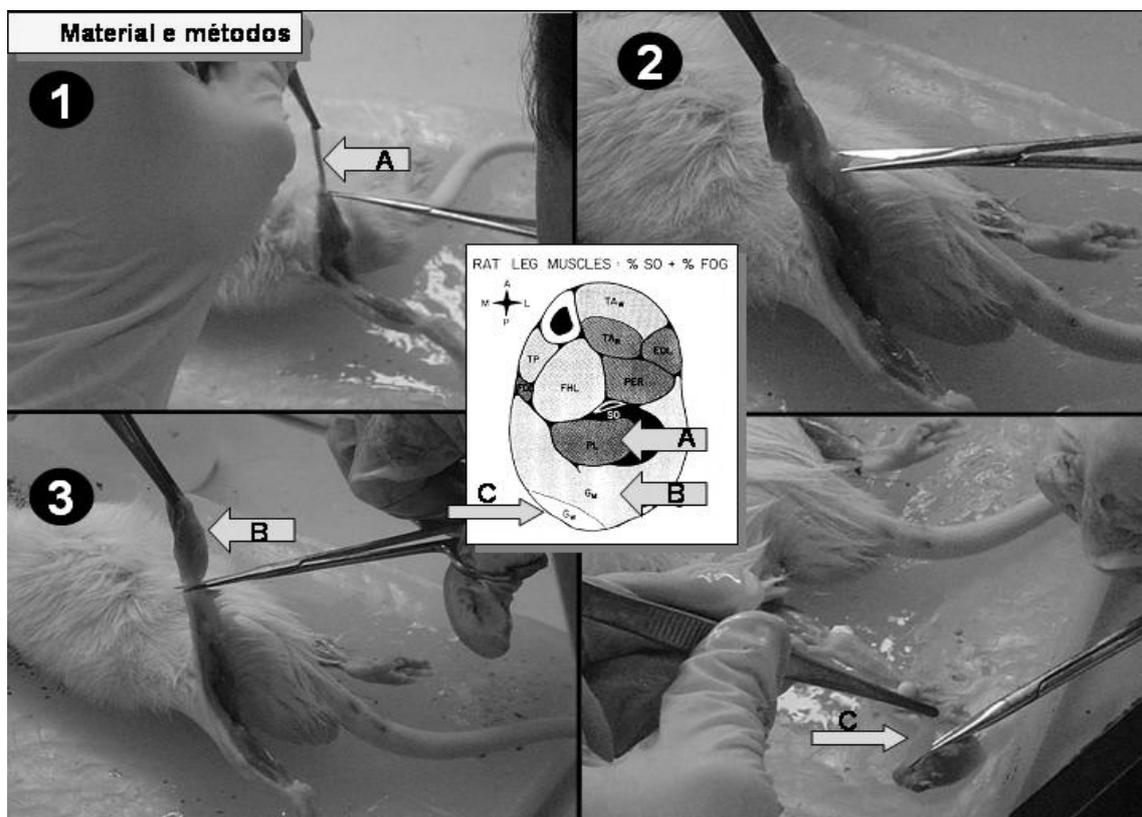


Figura 4 - Procedimentos para retirada dos músculos

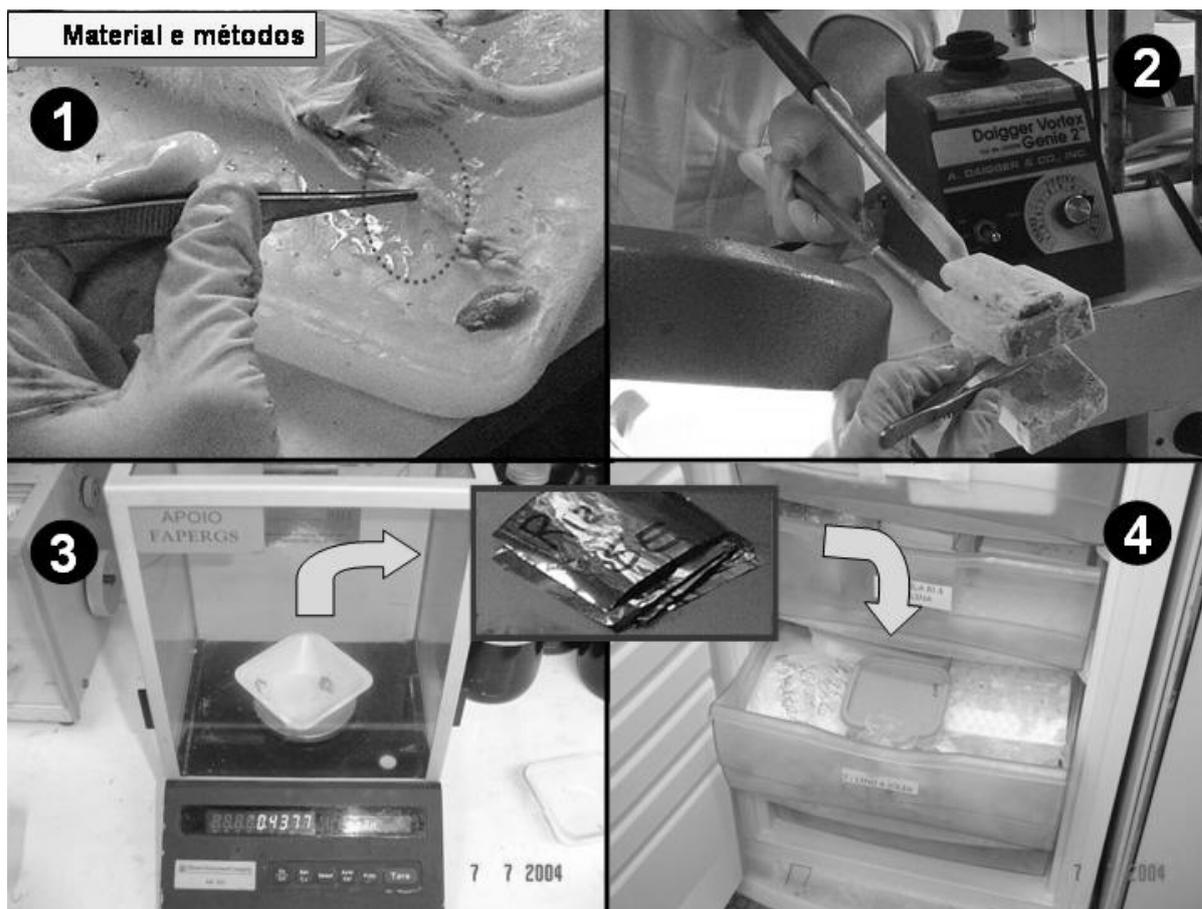


Figura 5 - Procedimentos após a retirada dos músculos

3.6 SDS-PAGE e “western blotting” para HSP70

Para análise da expressão de HSP70 (expressão de proteína), foram preparados homogenatos de músculo esquelético de rato (gastrocnêmio e sóleo) 6 horas após o término da sessão de uma hora de natação (período para expressão da HSP 70, SANTORO, 2000). Para cada amostra preparada, quantidades iguais de proteína (cerca de 30 μg , determinada pelo método Bradford, abaixo) foram separadas durante 2 h 30min (a 15 mA/gel) à temperatura ambiente (25°C) por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foi utilizado sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean II (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) e tampão

Material e métodos

Para cada amostra

Quantidades iguais de proteína (1,5 mg/mL) foram separadas por eletroforese (2h30min; 15 mA; à temperatura ambiente:25°C)

Foi utilizado um...



Sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean II (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA)

Contendo tampão de corrida constituído de Tris a 25 mM, glicina a 192 mM e SDS a 1% (m/v)

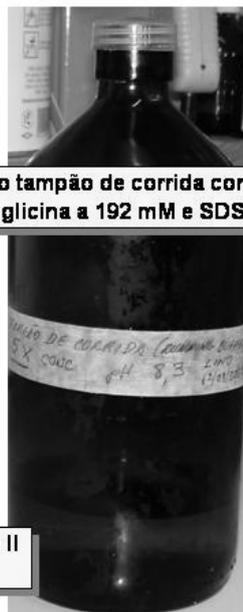


Figura 6 - Eletroforese: cuba e tampão de corrida

Gel de empilhamento (4%)	
Água desionizada	6,01mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5mL
SDS 10%	100µL
Bis-acrilamida	1,33mL
Persulfato de amônio	50µL
TEMED	10µL

Gel de separação (10%)	
Água desionizada	8,04mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	5mL
SDS 10%	200µL
Bis-acrilamida	6,66mL
Persulfato de amônio	100µL
TEMED	20µL

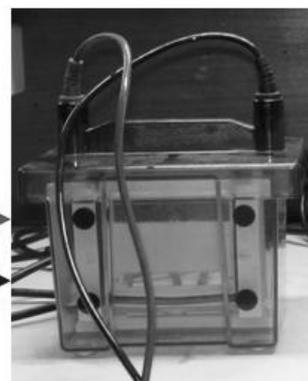


Figura 7 - Eletroforese: géis de empilhamento e de corrida

de corrida constituído de Tris a 25 mM, glicina a 192 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3 (figura 6), usando-se 1 cm de gel de empilhamento (entrada) a 4% (m/v) e gel de separação a 10% (m/v) em termos de monômero de acrilamida, para corridas em géis de 10 cm em tampão de amostra redutor constituído de Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol a 10% (v/v), SDS a 2% (v/v) e β -mercaptoetanol a 5%, conforme descrito em Kolberg et al. (2005) adaptado de Santoro et al. (1989) (figura 7). Como marcador de peso molecular foi utilizada a mistura de padrões de pesos moleculares previamente coloridos (INVITROGEN – Multimark, Multi-Colored Standard) com as seguintes proteínas: miosina (185 kDa), fosforilase b (98 kDa), desidrogenase glutâmica (52 kDa), anidrase carbônica (31 kDa) e lisosima (11 kDa) (figura 8).

Material e métodos

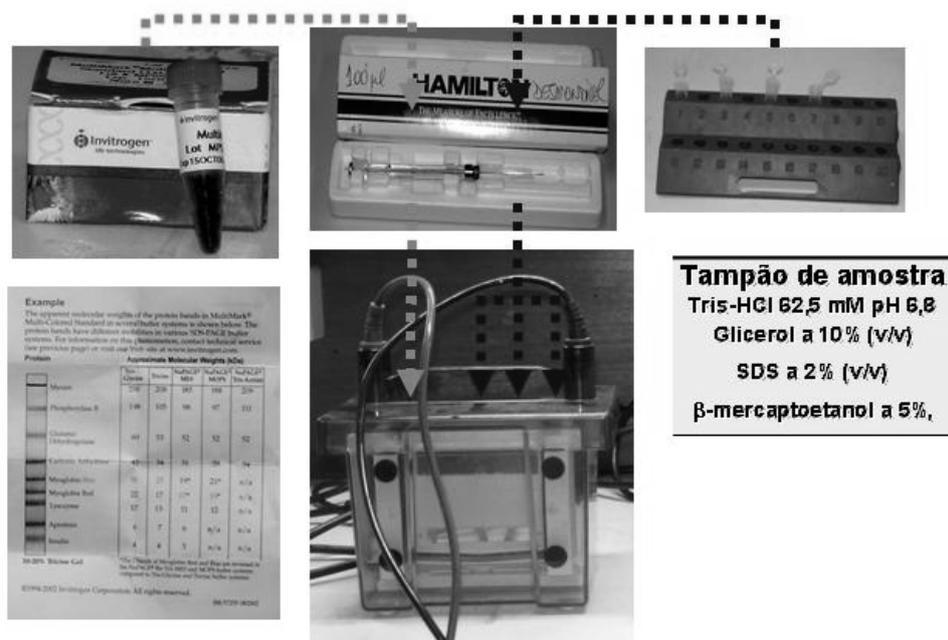


Figura 8 – Eletroforese: adição do padrão de peso molecular e das amostras.

Depois das corridas, os géis foram destacados das placas de suporte, os géis de entrada (de empilhamento) foram descartados e os géis de corrida foram divididos em duas porções ao nível da indicação correspondente a desidrogenase glutâmica (52 kDa).

As porções de gel contendo proteínas com peso molecular superior a 52 kDa foram submetidos a eletrotransferência. As porções contendo proteínas com peso molecular inferior a 52 kDa foram mergulhadas em solução de Azul Comassie Brilhante 0,1% (m/v), metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e mantidas sob agitação durante 20 min. Após esse tempo, estes géis foram descorados em solução de ácido acético glacial a 5% (v/v), sob agitação, até que fossem evidenciados os padrões de peso molecular (ainda fortemente corados contra o fundo já parcialmente descorado dos géis) (figura 9).

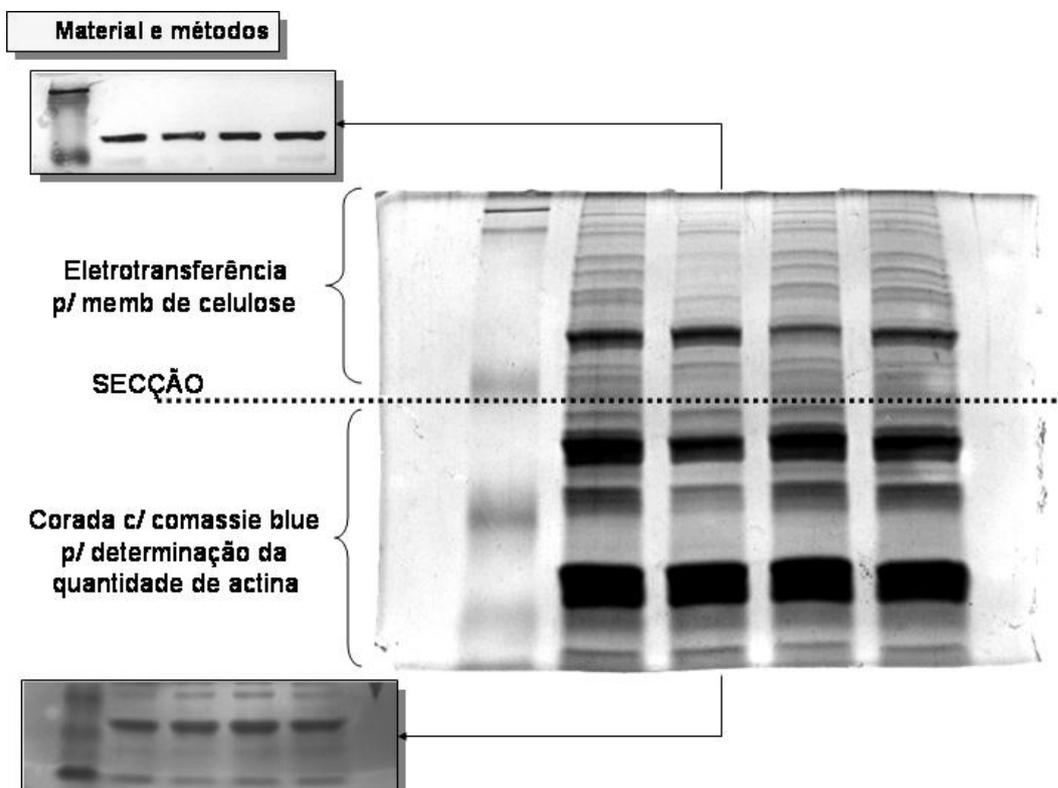


Figura 9 – Manejo dos géis após a corrida eletroforética.

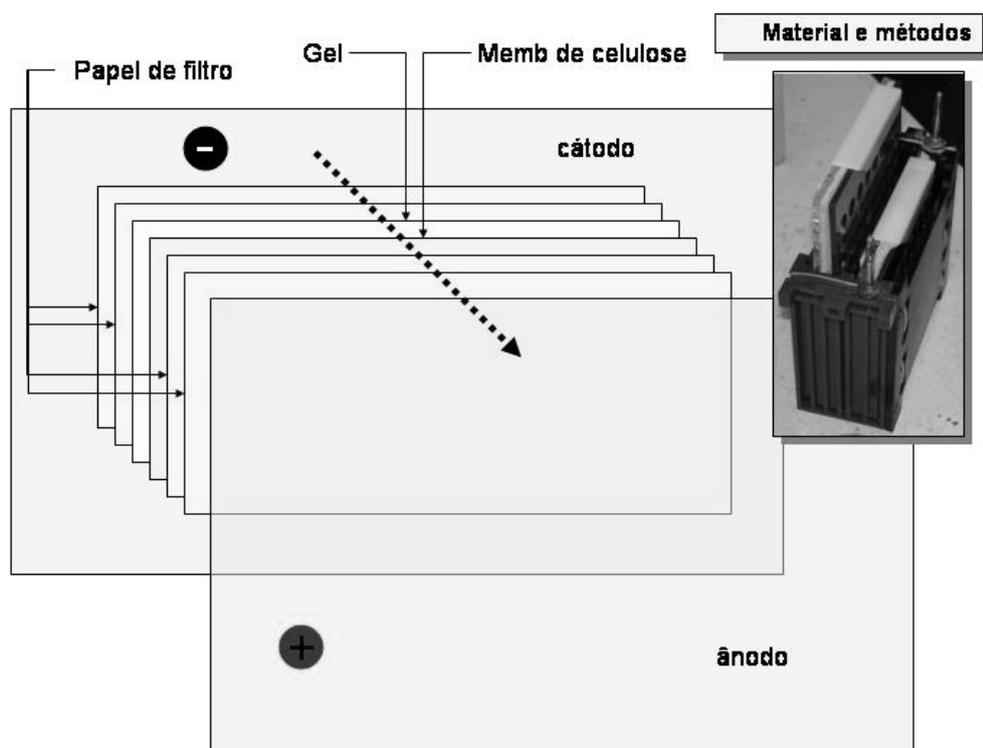


Figura 10 – Eletrotransferência, elementos e princípio

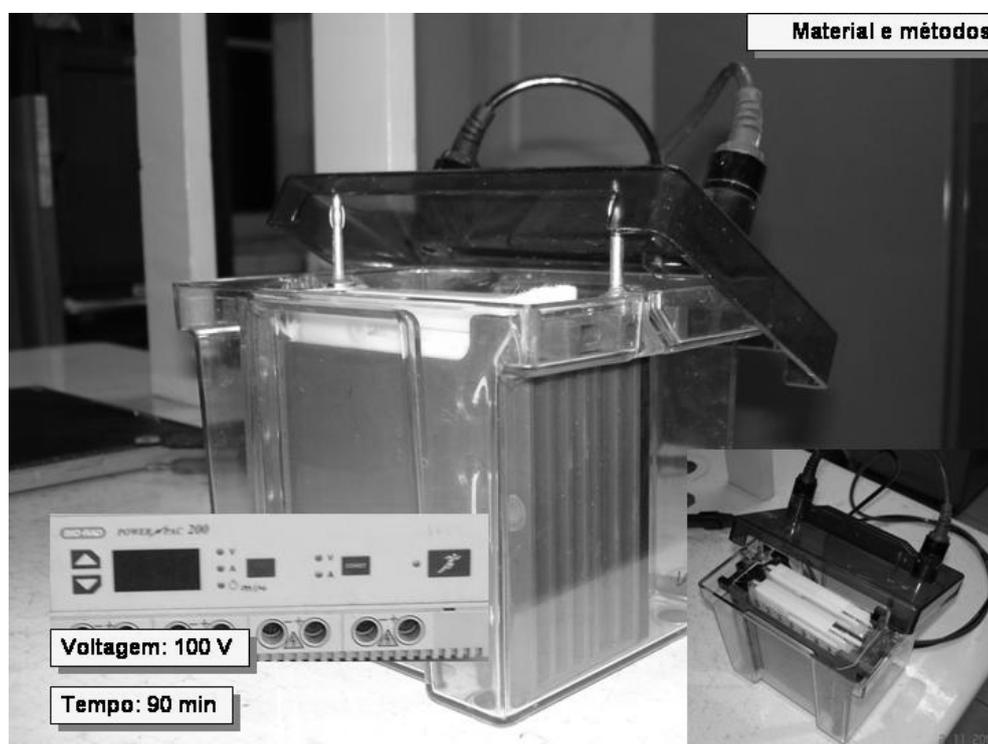


Figura 11 – Eletrotransferência, cuba BIO-RAD Mini-Protein II

As amostras contidas em géis destinados a processamento por “Western blotting”, como descrito em Elia e Santoro (1994), foram transferidas diretamente para membranas de nitrocelulose em sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 70 V até um total de 150 V x h (figuras 10 e 11). Após a transferência, as bandas, contendo proteínas, foram evidenciadas pela coloração com Vermelho Ponceau, sal de sódio (Sigma) a 0,3% (m/v) em solução de TCA a 3%. Após a verificação, as membranas foram descoradas em tampão TEN (Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM).

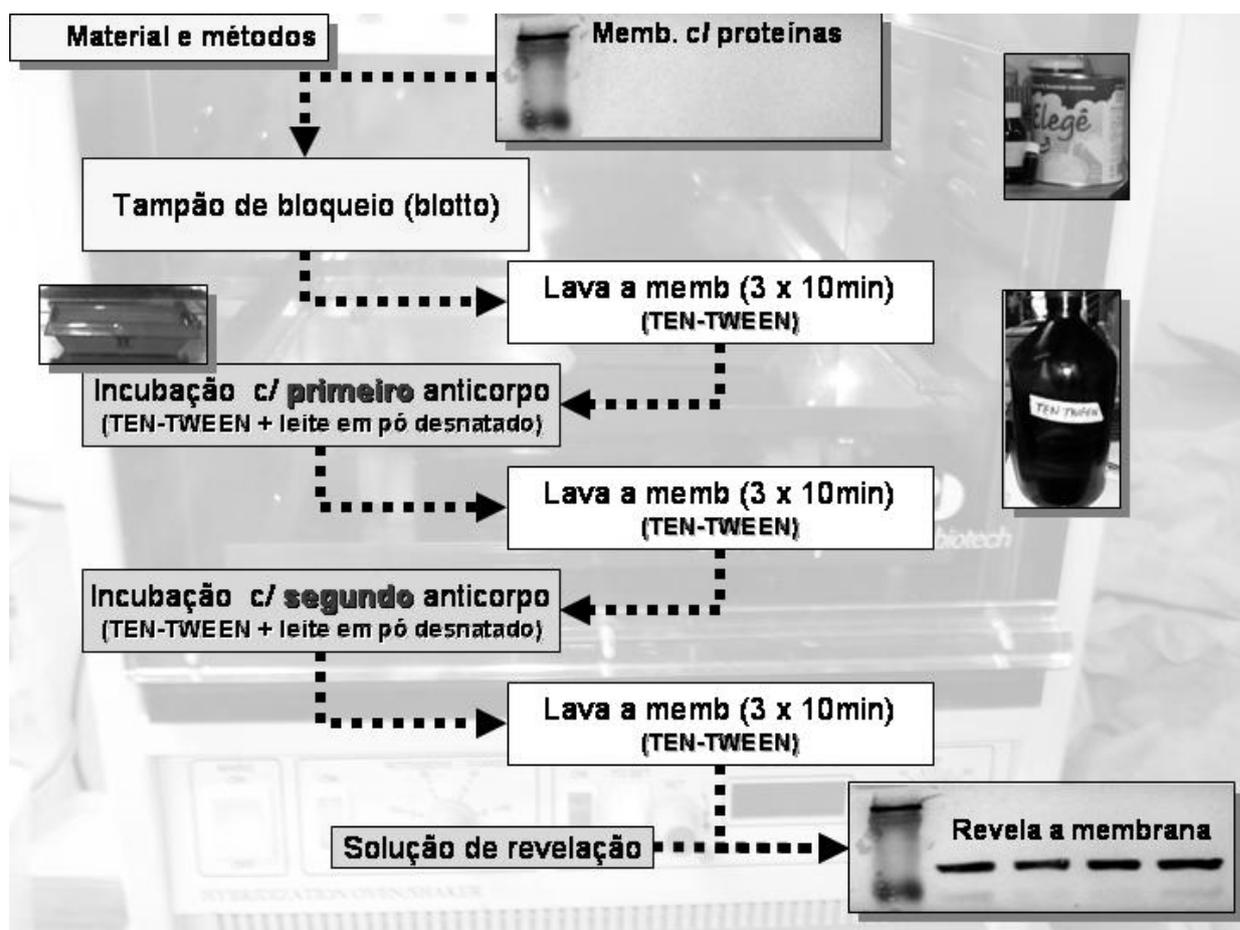


Figura 12 – Procedimentos de bloqueio da membrana e de “immunoblotting”

Os procedimentos de “immunoblotting” (figura 12) foram precedidos pelo bloqueio da membrana de nitrocelulose com uma solução de albumina sérica bovina a 1% (m/v) em água a fim de recobrir as porções da membrana onde não houve transferência de proteínas, evitando-se, dessa maneira, a ligação inespecífica dos anticorpos à membrana. Para o Western blotting das HSP70, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 h sob agitação contínua na presença de anticorpo monoclonal BRM-22 de ascite de camundongo (hibridoma BRM-22) contra HSP70 humana (Amersham), diluído a 1:1000 em solução de bloqueio. Este anticorpo reage especificamente com o polipeptídeo de 73 kDa, HSP73 (ou HSC70, proteína constitutiva) e com o de 72 kDa, HSP72 (ou HSP70 forma induzível). Depois disso, as membranas foram lavadas três vezes sob agitação por 10 min com 5 mL de TEN-Tween e incubados por 2 h com 5 mL de solução contendo o segundo anticorpo de coelho contra IgG de camundongo conjugado a peroxidase de rabanete (Sigma) sob agitação por 2 h. Após, as membranas foram novamente lavadas três vezes sob agitação por 10 min com 5 mL de TEN-Tween, e a seguir, submetidas a solução para revelação da peroxidase (DAB 1,67mM).

A solução de revelação foi preparada a fresco dissolvendo-se 6,01mg de 3,3'-diaminobenzidina, Sigma D5637 (tetra-HCl, FW 360,1), em 10 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7,6. A seguir adicionou-se, sob agitação, 10µl de H₂O₂ a 30% e colocou-se imediatamente a membrana para proceder a revelação. Imediatamente após o aparecimento das manchas de interesse com boa resolução, as membranas foram retiradas da solução de revelação e lavadas com água a fim de evitar-se superexposição. A seguir, as bandas obtidas foram registradas digitalmente (VDS, Amersham Pharmacia

Biotech) e as imagens analisadas por densitometria para os cálculos posteriores (figura 13).

Após esse procedimento, os géis foram submetidos a densitometria no equipamento (Amersham Pharmacia Biotech) Video Documentation System (VDS) de aquisição digital e processamento de imagens.

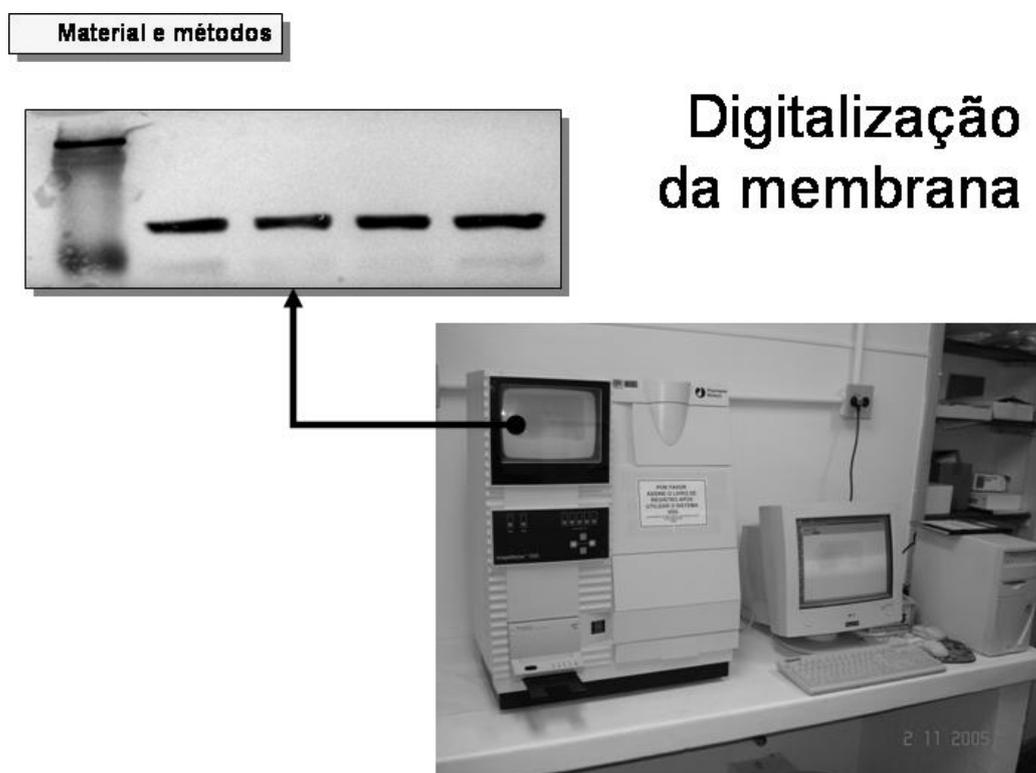


Figura 13 – Sistema VDS para digitalização das membranas

3.7 Determinação do conteúdo intracelular de GSH e GSSG

Para a determinação dos conteúdos intracelulares de glutathiona (GSH) e dissulfeto de glutathiona (forma “oxidada” da glutathiona, GSSG), os tecidos foram

retirados e imediatamente congelados. A seguir (figura 14), os músculos foram pesados e homogeneizados em ácido metafosfórico 5% (m/v) gelado, à razão de 5 mL / g, de tecido. O homogenato resultante foi centrifugado a 15000 x g por 5 min, a 4°C, sendo o sobrenadante utilizado para a análise cinético-espectrofotométrica pelo método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) e GSSG redutase (GSRd) de ANDERSON (1985).

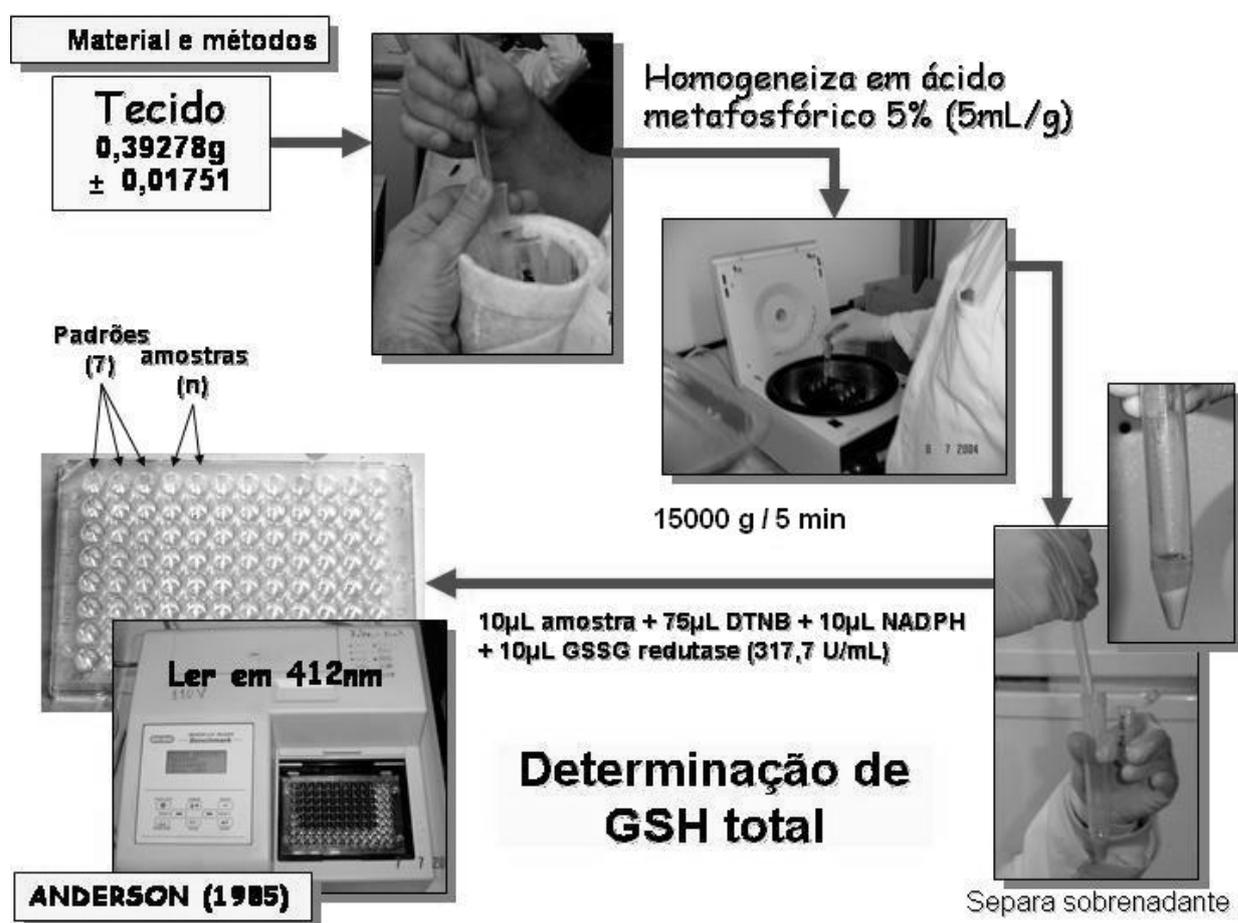


Figura 14 –Determinação da concentração total de glutathiona n (Anderson, 1985).

A primeira parte do ensaio consistiu na determinação do conteúdo de glutatona "total" (GSH + GSSG), medido em equivalentes de GSH pelo método da reciclagem com DTNB, que leva à oxidação estequiométrica da GSH em GSSG com formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e posterior restituição da GSH pela redução altamente específica com GSSG redutase (GSRd, EC 1.6.4.2) na presença de NADPH (figura 15).

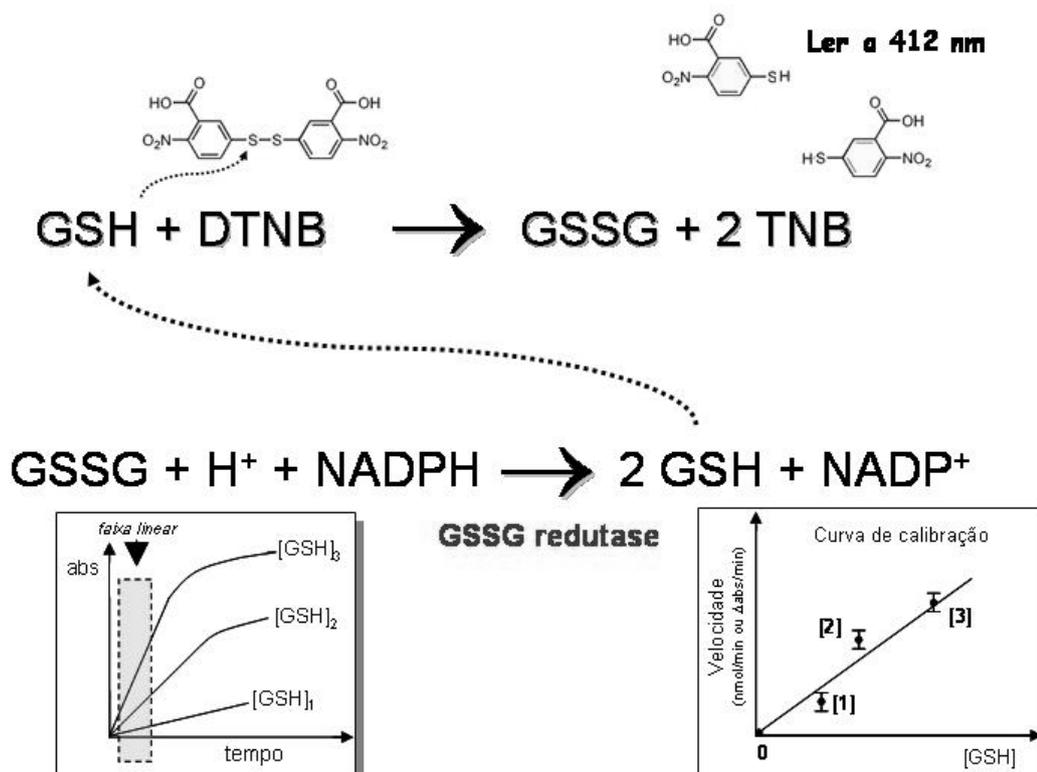


Figura 15 - Método da reciclagem com DTNB.

O ensaio foi realizado em microplacas de ELISA e a taxa de formação de TNB, proporcional à soma inicial de GSH e GSSG, foi monitorada a 412 nm ($\epsilon_{\text{TNB}} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em leitora de ELISA. Por essa razão, esta fase da determinação é conhecida como determinação dos valores de GSH "total". Embora não tenha nenhum sentido químico (uma vez que GSH e GSSG são espécies químicas diferentes) a

expressão visa a ressaltar que o que se mede nessas circunstâncias não é a GSH mas sim o somatório de moléculas de GSH e de GSSG que estavam presentes na amostra inicialmente, já que o princípio do método leva à medida do GSH presente na amostra (na primeira reação) e da GSSG (presente na amostra + aquela sintetizada na primeira reação). Para tanto, foi utilizada, em triplicata, uma curva de calibração (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 nmols em 10 μ L) com padrão de GSH (em MPA 5%) preparado na hora do ensaio e mantido em gelo para evitar auto-oxidação. A incubação dos padrões e das amostras em microplacas foi iniciada pela adição de 10 μ L de NADPH (concentração final 0,17 mM) e 70 μ L de DTNB (final 1,26 mM), ambos em tampão fosfato de sódio 143 mM (pH 7,5), a 10 μ L de amostra (em MPA 5%) completando um volume final de 90 μ L em cavidade (“wells”) de 0,221 cm de caminho óptico, a 37°C. Foi registrada a absorbância a 412 nm até a estabilização das leituras (12 min). Em seguida, foram adicionados 10 μ L de GSRd (atividade final na cavidade de 0,5 U/ml) sob agitação e as amostras foram analisadas espectrofotometricamente a 412 nm por cerca de 5 min adicionais.

Antes da determinação do conteúdo de GSSG, alíquotas de 100 μ L das mesmas amostras ensaiadas para GSH "total" foram retiradas para conjugação da GSH presente com N-etilmaleimida (NEM) segundo metodologia descrita em Akerboom e Sies (1981). Este procedimento torna-se necessário porque as reações para dosagem de GSH “total” medem simultaneamente a GSH e a GSSG das amostras, conforme discutido acima. Por isso, existe a necessidade de se “retirar” as moléculas de GSH das amostras sem, no entanto, oxidá-las a GSSG. A solução para esta questão é a reação de conjugação da GSH presente inicialmente nas amostras com um agente que conjuga mas não oxida a GSH a GSSG: a NEM (figura 16).

Foram adicionados, então, 35 μL de NEM 200 mM (concentração final 50 mM) diretamente às amostras dissolvidas em MPA 5%. A seguir, a mistura foi neutralizada, cuidadosamente sob agitação, até pH 5,5 pela adição de 20 μL de KOH 2 M em tampão de ácido piperazina-N,N'-bis-(etanossulfônico) (PIPES, Boehringer, $\text{pK}_a = 6,8$ a 25°C , faixa de trabalho de 6,1 a 7,5) 0,3 M. O PIPES foi incluído para pre-

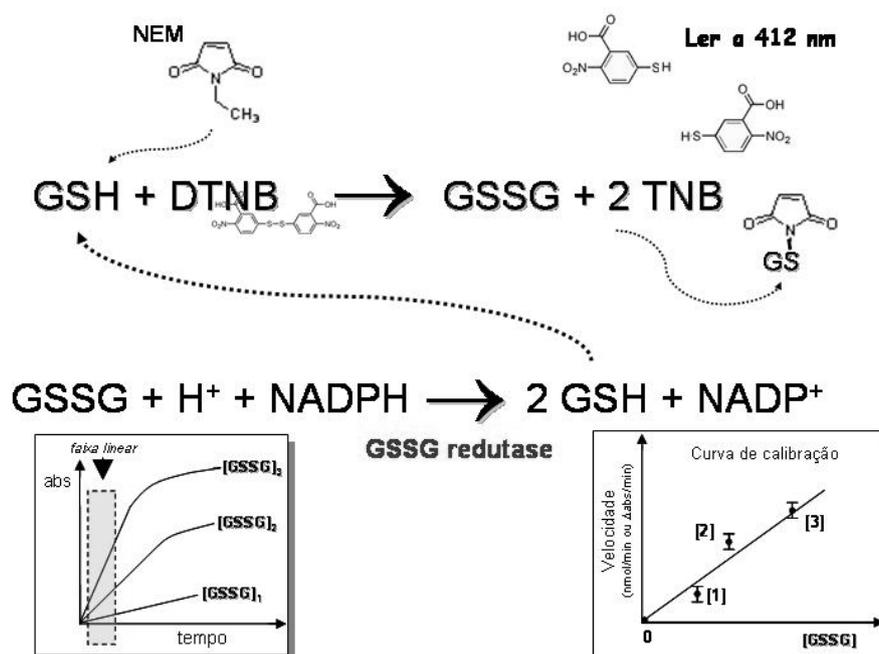


Figura 16 – Determinação do conteúdo inicial de GSSG na amostra.

venir a ocorrência de microambientes alcalinos, durante a neutralização, o que levaria a auto-oxidação da GSH, favorecida em pHs maiores que 7,0. O excesso de NEM, que inibe o processo de dosagem da GSSG por reciclagem em até 30% (uma vez que consome a GSH formada na segunda reação do ensaio), foi extraído com três volumes, de 500 μL cada, do solvente orgânico acetato de etila. O solvente era adicionado e o Eppendorf[®] agitado. A seguir, o excesso de solvente era retirado por sucção com bomba de vácuo. Este procedimento foi repetido três vezes, sendo que na última vez, o excesso

de solvente foi evaporado em concentrador centrífugo tipo SpeedVac (Univapo, Uniequip, Alemanha). Posteriormente, cerca de 10 μL de amostra foram ensaiados pelo método da reciclagem, exatamente como descrito para a GSH, exceto que as amostras foram inicialmente incubadas com a GSRd por 5 min a 37°C, tendo sido monitorada a absorbância a 340 nm (consumo de NADPH) até a estabilização. Depois, foi adicionado o DTNB e as leituras a 412 nm (produção de TNB) foram acompanhadas conforme descrito acima (figura 17).

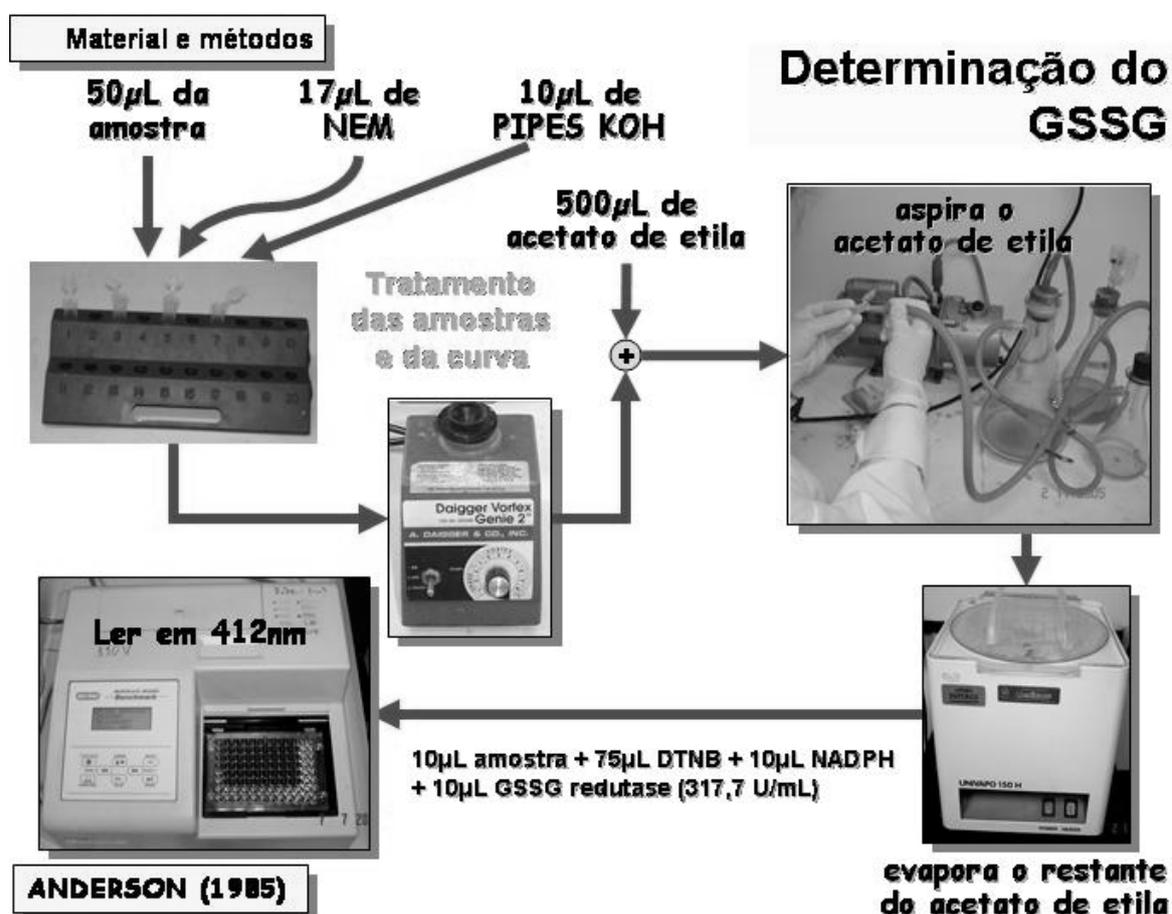


Figura 17 – Determinação da concentração inicial de GSSG (Anderson, 1985).

A diferença entre os valores obtidos para glutathiona "total" e GSSG foram utilizados para determinação dos valores de GSH procurados, de acordo com a fórmula:

$$\begin{array}{c}
 \boxed{[\text{GSH}]_{\text{TOTAL}} = [\text{GSH}] + 2[\text{GSSG}]} \\
 \begin{array}{ccc}
 \uparrow & & \uparrow \\
 \boxed{\text{CONHECIDO}} & & \boxed{\text{CONHECIDO}}
 \end{array}
 \end{array}$$

$$\boxed{[\text{GSH}] = [\text{GSH}]_{\text{TOTAL}} - 2 [\text{GSSG}]}$$

Figura 18 – Cálculo da concentração inicial de GSH

3.8 Análise das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), imediatamente após as sessões de exercício, amostras de músculo foram retiradas e congeladas, da mesma forma como descrito nos procedimentos anteriores, para serem processadas para TBARS conforme metodologia adaptada de Buege E Aust (1978) e Draper et al. (1993).

Depois de retirados, congelados e pesados, como descrito anteriormente, as amostras foram homogeneizadas manualmente (Potter-Elvehjem) em ácido tricloroacético (TCA) 15% m/v (à razão de 5 mL por grama de tecido) contendo 15 µL de hidroxitolueno butilado (BHT) 29,5 mM por mL (adicionado na hora) para evitar a auto-oxidação de lípidos. Na seqüência, as amostras foram fervidas por 30 min, centrifugadas a 15000 x g por 5 min a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado para a análise. O procedimento completo consistiu em alíquotar-se 250 µL de amostra

(sobrenadante do homogenato em TCA, equivalente a aproximadamente 40 µg de proteína) em tubo Eppendorf® de 1,5 mL, misturando-se com 200 µL de TCA 30% e 200 µL de Tris-HCl (10 mM pH 7,4) que foram centrifugados a 2500 x g por 10 minutos a 4°C, sendo posteriormente coletados 440 µL do sobrenadante, aos quais foram adicionados 200 µL de TBA (0,73% m/v), 10 µL de BHT. Este material foi fervido a 100°C por 15 min. e lido espectrofotometricamente a 535 nm, diretamente contra mistura contendo 50 µL de água, 200 µL de TCA, 200 µL de Tris-HCl, 10 µL de BHT e 200 µL de TBA fervido paralelamente.

Cálculos:

$$A_{535 \text{ nm}}/0,156 = \text{nmol de equivalentes de MDA/mL/cm}$$

3.9 Determinação do conteúdo intracelular de glicogênio

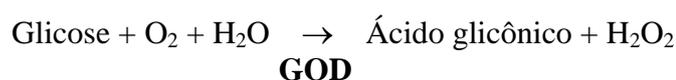
As amostras de tecido (gastrocnêmio vermelho) foram inicialmente fatiadas e fervidas por sessenta minutos em tubos cônicos com hidróxido de potássio a 30% (50 mg de tecido em 2 mL de KOH 30%). Após, a mistura foi desidratada em tampão Na₂SO₄ saturado, sendo os tubos gentilmente agitados. Acrescentou-se, então, 4,5 mL de álcool etílico 70% e voltou-se a agitar os tubos, agora no Vórtex®. A seguir, o material foi centrifugado a 1200 x g (3000 rpm em centrífuga ALC com rotor 5835), por 10 min, sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi novamente solubilizado, agora em água quente (80°C). Após a solubilização, acrescentou-se o álcool etílico novamente, agitou-se e centrifugou-se (3000 rpm / 10 min) novamente a mistura. O sobrenadante foi novamente descartado e todo este procedimento foi repetido mais uma vez. Após a terceira vez, os tubos foram deixados invertidos para secar.

No momento da dosagem do glicogênio foi feita uma curva de glicogênio a partir de uma solução estoque de 1 mg / mL, que foi misturado ao ácido clorídrico (HCl 4N) conforme tabela 1:

Tabela 1 - Curva de glicogênio a partir de solução estoque de 1 mg / ml

Padrão	Glicogênio (μL da solução padrão)	HCl 4N (μL)
P1	100	400
P2	150	350
P3	200	300

Para proceder à dosagem do glicogênio das amostras, ressuspendeu-se o precipitado de cada uma em um volume de 2 mL de água destilada quente (80°C). Desta suspensão foram obtidos 500 μL que foram misturados com 500 μL de ácido clorídrico (HCl 4N). As amostras foram aquecidas, então, a 100 °C por 60 min com bolinhas de gude na boca do tubo para evitar evaporação. Concluída a hidrólise ácida do glicogênio, os tubos foram deixados resfriar a temperatura ambiente. Após neutralizou-se a mistura com Na_2CO_3 2 M, agitando-se com cuidado para não derramar. Depois que todo o dióxido de carbono foi liberado, procedeu-se à dosagem da glicose com o Kit Glicose PAP Liquiform Cat. 84 da Labtest Diagnóstica S.A. Foi utilizado o método de ponto final, preconizado pelo fabricante, baseado na formação de peróxido de hidrogênio e ácido glicônico, a partir de glicose, por ação da glicose oxidase (GOD), conforme apresentado abaixo:



O peróxido de hidrogênio estequiometricamente formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma

reação oxidativa de acoplamento formando um antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.



POD

A absorvância das amostras e do padrão é lida em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 505 nm. A concentração de glicose na amostra, em mg / dL, é obtida multiplicando-se a absorvância das amostras por um fator de calibração determinado a partir da divisão de 100 pela absorvância do padrão.

3.10 Determinação colorimétrica de nitratos e nitritos nas amostras

Considerando-se que a medida direta da produção de NO (gás) “online” é extremamente complexa e envolve eletrodos e equipamentos de que não dispunhamos, investigamos o metabolismo do NO de duas formas: pelo bloqueio das NO sintases (NOS) através da administração do inibidor L-NAME e através da medida do conteúdo de nitratos e nitritos na musculatura estudada. Os resultados obtidos foram comparados com a expressão de HSP70.

Para a estimativa da produção de NO nos músculos analisados, foram efetuadas medidas dos conteúdos musculares de nitratos e nitritos em microplacas pelo método da nitrato redutase/reagente de Griess.

A técnica de determinação utilizada baseia-se na redução enzimática de nitratos (NO_3^-) a nitritos (NO_2^-) na presença de nitrato redutase (EC 1.6.6.2) de *Aspergillus*, NADPH e FAD, e posterior reação dos nitritos formados (ou presentes inicialmente nas amostras) com o reagente de Griess (mistura de sulfanilamida e naftiletilenodiamina, específico para NO_2^-).

Os tecidos retirados, congelados e pesados, como descrito anteriormente, foram manualmente (Potter-Elvehjem) homogeneizados em PBS²⁸, pH 7,4 (5 a 10 mL/g de tecido) e centrifugados a 10.000 x g por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram ultracentrifugados a 100.000 x g por 15 min a 4 °C (ou em centrífuga de alta velocidade impondo-se o mesmo efeito centrífugo, $\omega^2.t$). A seguir, as amostras foram ultrafiltradas em filtros de cut-off de 10 a 30 kDa (Amicon ou Millipore ou Sigma M0911 – PTGC polysulfone membrane – cut-off 10 kDa low-protein binding adsorption for serum and plasma – ultrafree MC filter unit – 400 μ l – máx. 5.000 x g por 2 h).

Dos ultrafiltrados das amostras foram pipetados até 80 μ L em cavidades de uma placa de microleitora de ELISA. Após, foram acrescentados, na ordem, 10 μ l da mistura de cofatores²⁹ e 10 μ l de nitrato redutase 1 U/ml. Procedeu-se, então, a incubação das amostras a temperatura de 37 °C por 3 h. A sensibilidade deste método para nitratos, utilizando-se um máximo de 80 μ l, é de cerca de 2,5 μ M. Para ensaio de nitritos apenas (sem a reação de redução com nitrato redutase), onde se pode utilizar até 100 μ l de amostra, o limite de detecção é de aproximadamente 2,0 μ M.

Ao final do período de incubação, acrescentou-se 50 μ L de reagente de Griess I (SULFA), seguido de mais 50 μ l de reagente de Griess II (NEDD). Agitou-se e incubou-se na própria leitora à temperatura ambiente (25 °C) por 10 min, fazendo-se, em seguida, a leitura a 540 nm. A concentração de nitrito foi determinada com base em uma curva padrão de nitratos e de nitritos (GRANGER et al., 1995).

²⁸ salina tampão-fosfato

²⁹ A mistura de cofatores foi preparada no momento do ensaio pela adição de 10 μ l de NADPH 24,15 mM, 10 μ l de FAD 1,206 mM e 95 μ l de tampão fosfato. As concentrações dos cofatores na mistura são: 0,105 mM de FAD e 2,100 mM de NADPH.

A quantidade de NO_x nas amostras, após homogeneização e dosagem, foi calculada com base na seguinte fórmula:

$$\text{NO}_x \text{ (nmol/g de tecido)} = \frac{\text{concentração } (\mu\text{M}) \times [\text{volume do homogenato (ml)} + 0,7 \times \text{peso(g)}]}{\text{peso do tecido (g)}}$$

3.11 Cálculo das concentrações de proteínas nas amostras analisadas

Na determinação das concentrações de proteínas das amostras foi utilizado o método de BRADFORD (1976), que está baseado na ligação do Azul Comassie Brilhante G-250 0,01% (m/v), em meio de ácido fosfórico 8,5% (m/v)-etanol 4,7% (m/v), a proteínas das amostras com formação de um complexo que absorve intensamente a 595 nm (BIO-RAD Protein Assay kit, Bio-Rad Laboratories, GmbH, DR). Este método, que usa soluções de albumina sérica bovina (BSA) fração V (Sigma) como padrão de referência, apresenta, na faixa de algumas dezenas de microgramas de proteína ensaiada, sensibilidade um pouco maior que o método de LOWRY et al. (1951), e por isso foi o escolhido.

3.12 Análise estatística

Os dados foram analisados através de procedimentos estatísticos descritivo e inferencial.

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média.

As concentrações de lactato plasmático, de glicogênio e de glutathione foram analisados por teste *t* de Student bicaudado para dados não pareados.

A expressão de HSP70 entre os grupos controle-salina, controle-L-NAME, exercício-salina e exercício-L-NAME foi avaliada por análise de variância (ANOVA) de duas vias. Quando o valor de F era significativo, a comparação entre as médias amostrais foi complementada com os testes *t* de Dunnett.

O nível de significância para a probabilidade α de erros do tipo I no teste de hipóteses foi fixado em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Concentração plasmática de lactato

A concentração sanguínea de lactato nos fornece uma estimativa da intensidade de esforço. Quanto mais exigente é o esforço, maior é a concentração de lactato no sangue (SILVEIRA E DENADAI, 2002). Desta forma, podemos considerar solicitação do exercício imposto aos nossos animais como bastante eficaz do ponto de vista orgânico, uma vez que observamos um aumento de 3,5 vezes ($13,1 \pm 1,7$ mmol/L; n=3) na concentração de lactato, após o esforço, em relação ao valor pré-exercício ($3,8 \pm 0,6$ mmol/L; n=3). Essa diferença entre as médias antes e após o esforço foi analisada com o teste *t* de Student pareado, sendo considerada significativa para $p < 0,05$ (figura 19).

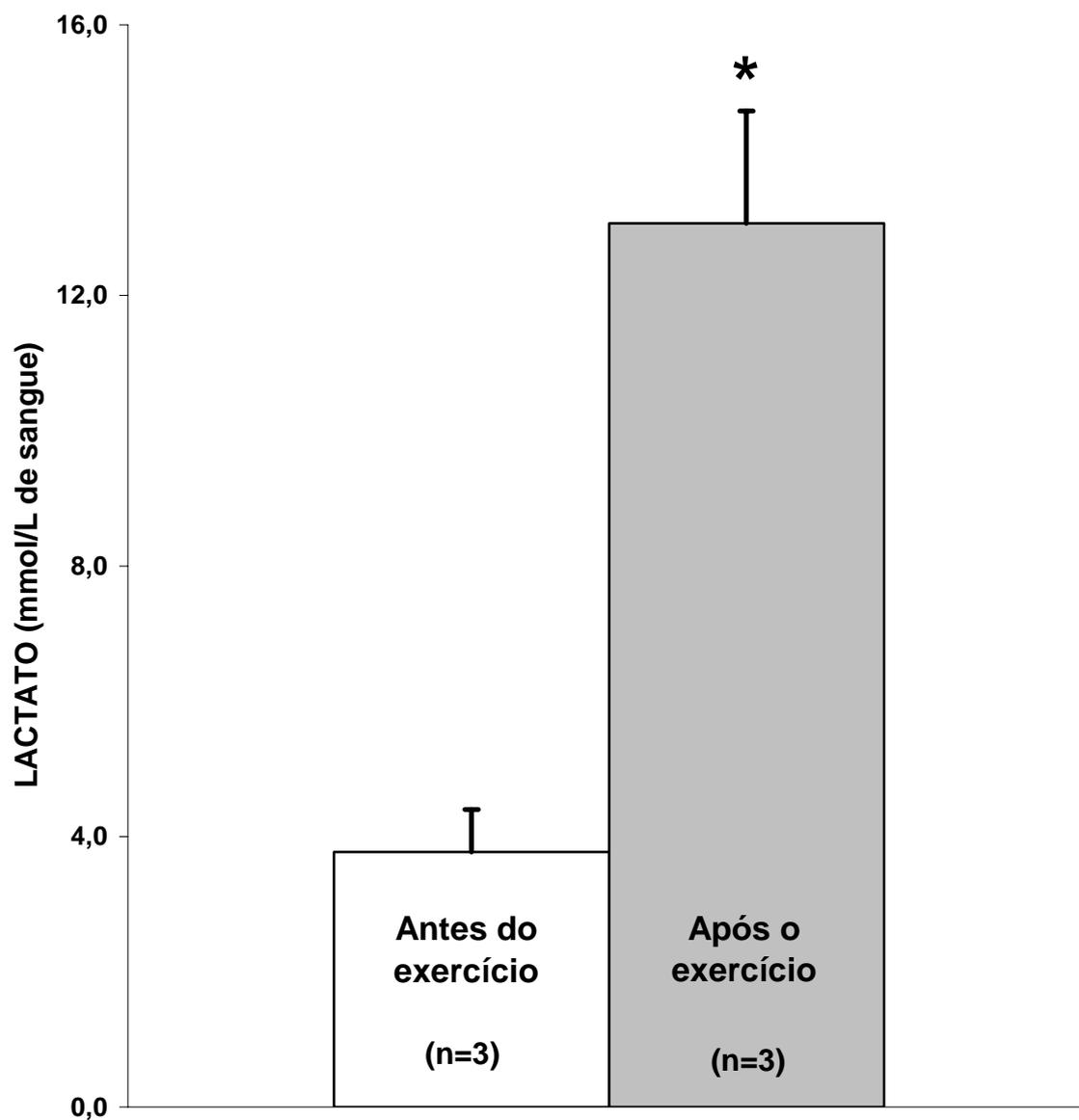


Figura 19 Comparação entre a concentração média de lactato no sangue obtido imediatamente antes e logo após uma hora de natação. Amostras de sangue de três animais tomados ao acaso em cada grupo foram obtidas e analisadas conforme descrito na seção de Métodos. A diferença entre as médias, com base no teste *t* de Student pareado, é significativa ($p < 0,05$).

4.2 Exercício e expressão de HSP

4.2.1 Exercício e expressão de HSP no sóleo

A análise da expressão relativa de HSP70 entre os grupos controle e exercício (figura 20) mostra que o exercício não foi capaz de deflagrar uma resposta de estresse no músculo sóleo, composto essencialmente de fibras bastante oxidativas, pelo menos a julgar pela expressão de HSP70 seis horas após a sessão de exercício agudo.

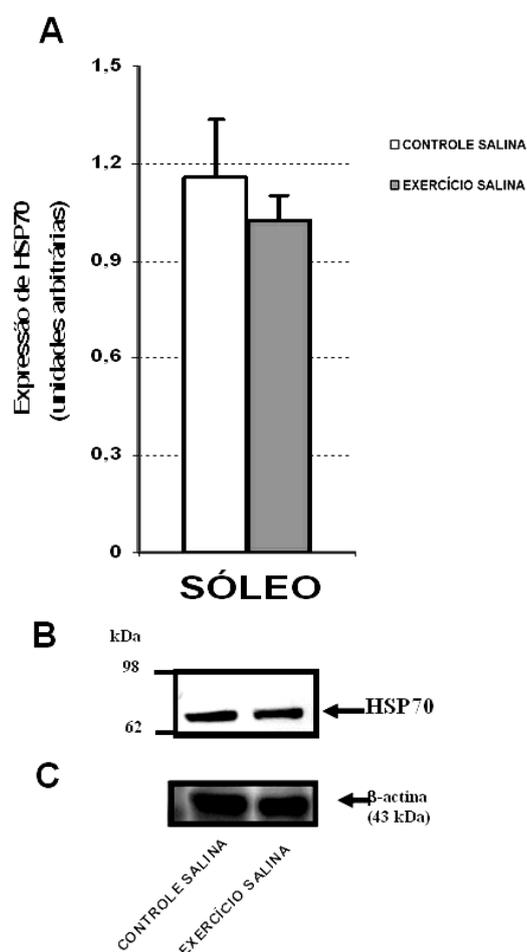


Figura 20 Expressão relativa de HSP70 no músculo sóleo de ratos controle (n=3) e exercício (n=3) que receberam salina (i.p.). A: expressão relativa de HSP70; B: bandas de HSP70 reveladas na membrana de nitrocelulose; C: bandas de actina no gel de poliacrilamida. A diferença entre as médias, com base no teste *t* de Student pareado, não é significativa.

4.2.2 Exercício e expressão de HSP no gastrocnêmio

Quando comparamos a expressão relativa de HSP70 no músculo gastrocnêmio, com um conteúdo proporcionalmente maior de fibras anaeróbias de resposta rápida, os resultados mostraram que exercício foi capaz de aumentar a expressão da proteína em cerca de 33 %. Esta diferença, com base no teste *t* de Student pareado, é significativa ($p < 0,05$) e sugere que este tipo de musculatura seja mais susceptível ao estresse celular que a musculatura solear (figura 21).

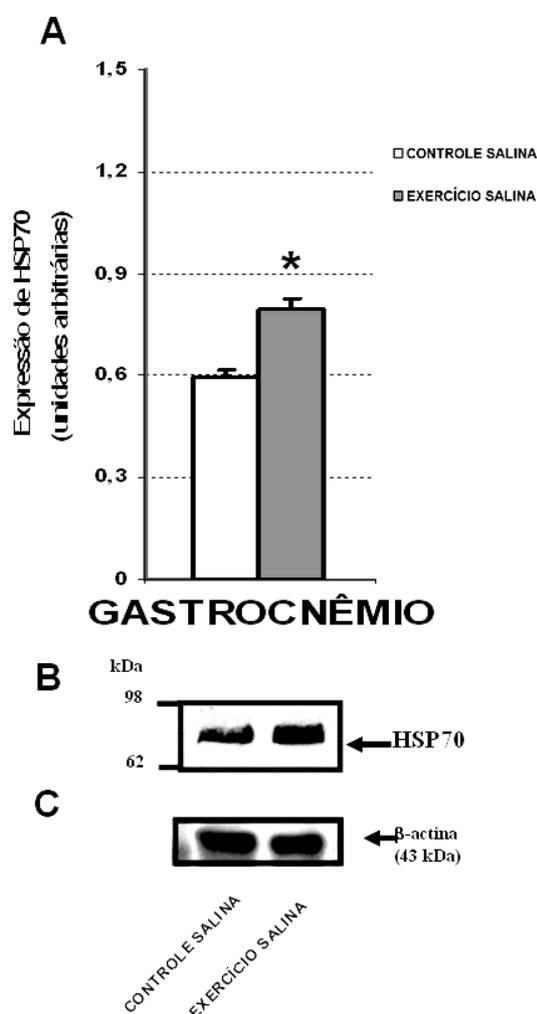


Figura 21 Expressão relativa de HSP70 no músculo gastrocnêmio de ratos controle ($n=3$) e exercício ($n=3$) que receberam salina (i.p.). A: expressão relativa de HSP70; B: bandas de HSP70 reveladas na membrana de nitrocelulose; C: bandas de actina no gel de poliacrilamida. A diferença entre as médias, com base no teste *t* de Student pareado, é significativa ($p < 0,05$).

4.3 Estresse oxidativo

Uma vez que a expressão de HSP70 mostrou aumento induzido pelo exercício físico apenas no músculo gastrocnêmio, decidimos investigar o estresse oxidativo apenas neste músculo.

4.3.1 Concentração de glutatona

Inicialmente, foram medidas as concentrações da forma reduzida da glutatona (GSH) nos animais em estudo. Os resultados mostraram uma forte queda na quantidade de GSH do grupo controle ($1359,83 \pm 344,61$ nmol/g de tecido) para os animais exercitados ($540,89 \pm 109,71$ nmol/g de tecido). Esta diferença de 60,2% na concentração de GSH no tecido muscular foi considerada estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e sugere que um processo oxidativo intenso deva estar ocorrendo no músculo gastrocnêmio (figura 22).

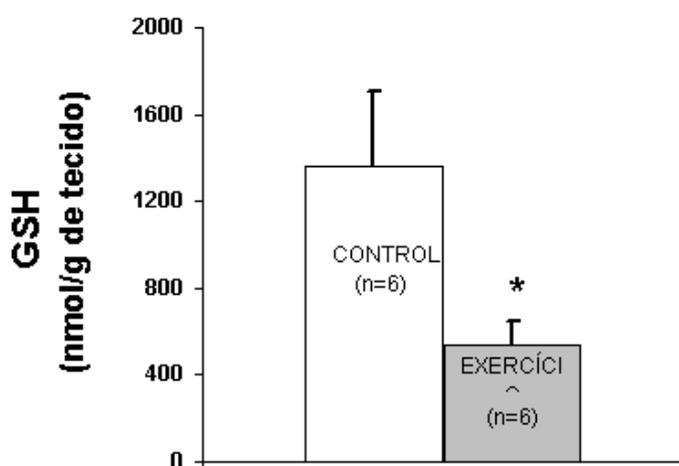


Figura 22 Concentração de glutatona (GSH) em homogenato de músculo gastrocnêmio de animais controle e submetidos a exercício. Os valores GSH foram obtidos após subtração da quantidade de GSSG a partir das determinações de GSH_{TOTAL} , conforme descrito na seção de Métodos. A diferença entre as médias, com base no teste *t* de Student pareado, é significativa com $p < 0,05$.

4.3.2 Concentração de dissulfeto de glutathiona

As concentrações de dissulfeto de glutathiona (GSSG) nos animais do grupo controle foi de $215,77 \pm 16,10$ nmol/g de tecido (figura 23), enquanto nos animais do grupo exercício a concentração foi de $347,37 \pm 52,68$. Esta diferença correspondeu a um aumento de 61 % ($p < 0,05$) na concentração de GSSG, em perfeita consonância com os dados observados para a quantidade de GSH intramuscular (figura 22). Estes achados sugerem que o exercício esteja promovendo consumo de GSH que estaria sendo convertida em GSSG.

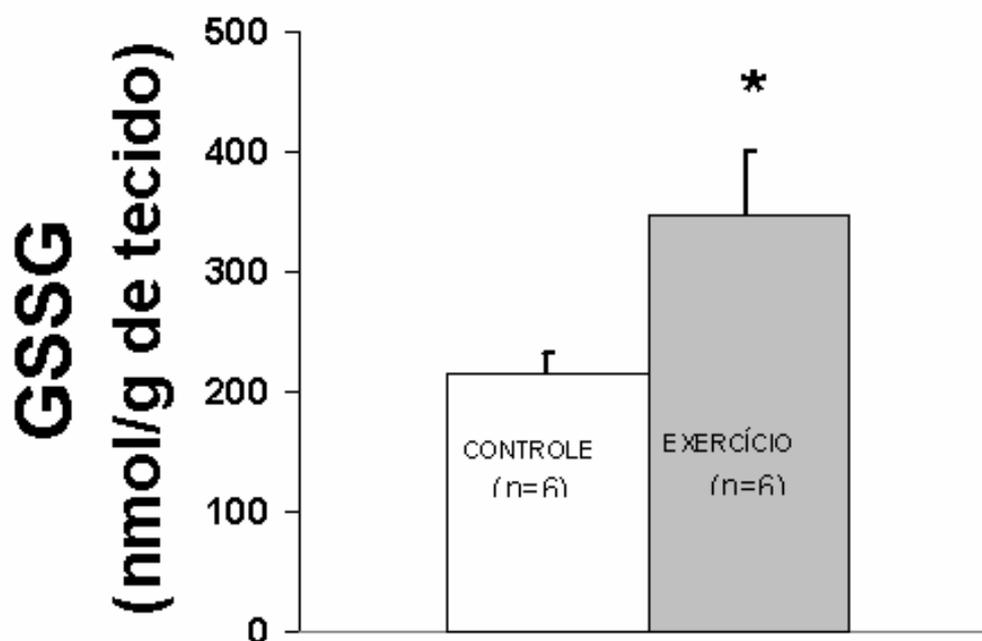


Figura 23 Concentração de dissulfeto de glutathiona (GSSG) em homogenato de músculo gastrocnêmio de animais controle e submetidos a exercício. Observa-se uma diferença de 61 % entre o grupo controle e o grupo exercício. A diferença entre as médias, com base no teste *t* de Student pareado, é significativa com $p < 0,05$.

4.3.3 Relação dissulfeto de glutaciona/glutaciona

O resultado da análise, para o músculo gastrocnêmio vermelho, da relação [GSSG]/[GSH] do grupo controle foi $0,2345 \pm 0,0626$ (n=5), enquanto para o grupo exercício foi $0,5664 \pm 0,0393$ (n=6). Portanto, a relação [GSSG]/[GSH] do grupo exercício-salina foi 2,4 vezes maior que a do grupo controle-salina (figura 24). Essa diferença, analisada através de teste *t* de Student pareado, foi considerada altamente significativa para $p < 0,005$ e reflete uma incontestável situação de estresse.

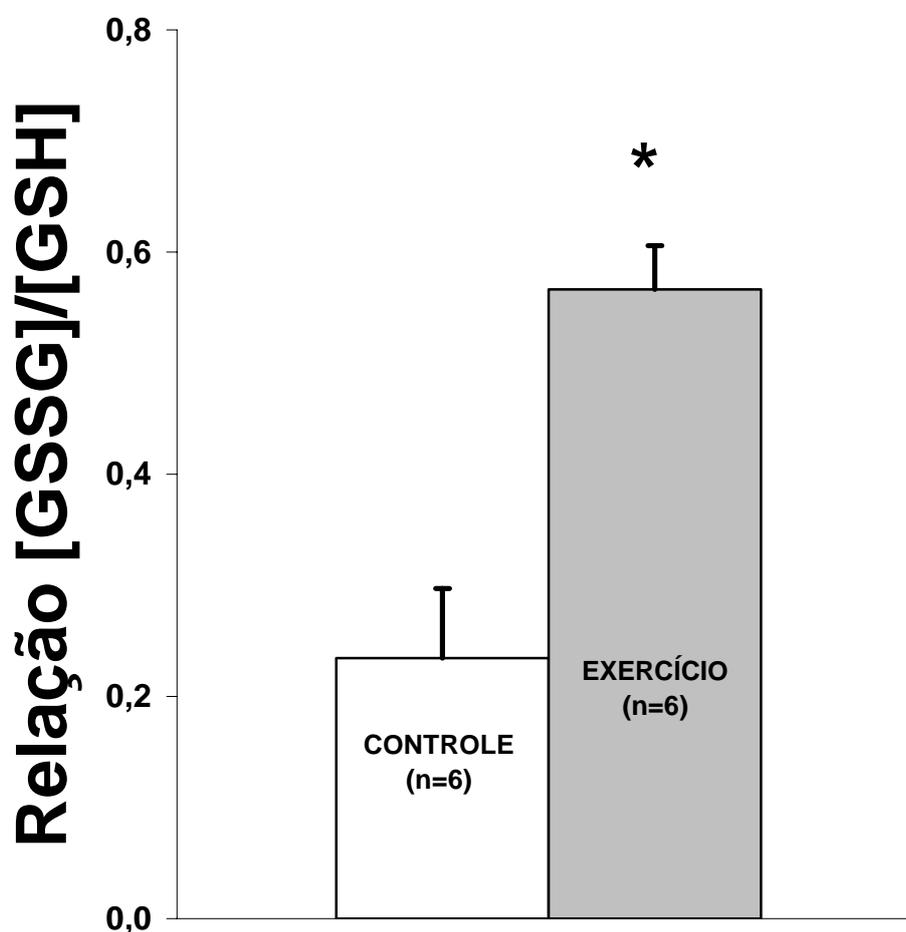


Figura 24 Comparação da relação GSSG/GSH para os grupos controle (não submetidos à exercício) e exercício (uma hora de natação com 5% do PCT fixado ao corpo). Foi realizado teste *t* de Student não-pareado. A diferença entre as médias é significativa ($p < 0,05$).

4.3.4 Conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Conforme mostrado anteriormente, a relação [GSSG]/[GSH] do grupo exercício-salina foi 2,4 vezes maior que a do grupo controle-salina (figura 24). Este dado sugere uma forte tendência de estresse oxidativo, isto é, um desbalanço redox em favor da formação de espécies mais oxidantes.

Na maioria dos tipos celulares e tecidos estudados, o estresse oxidativo “tende” a ser acompanhado de processos de formação de espécies ativas do oxigênio e lipoperoxidação. Por isso, investigamos a possibilidade de que o desbalanço redox do músculo gastrocnêmio pudesse estar ocorrendo em paralelo à formação de lipoperóxidos. Para tanto, foi estimado, através da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o conteúdo de malondialdeído (MDA) que é um indicativo da ocorrência de lipoperoxidação (figura 25). No entanto, o fato de não termos observado diferenças significativas no conteúdo de MDA pode ser devido ao fato de que esta técnica não tenha sido suficientemente sensível para evidenciar a ocorrência de lipoperoxidação no gastrocnêmio, uma vez que a carga de exercício foi suficiente para produzir incrementos na lactícemia (Fig. 19) e nos índices de estresse oxidativo (Fig. 22 a 24), especialmente o estado redox, avaliado pela relação [GSSG]/[GSH].

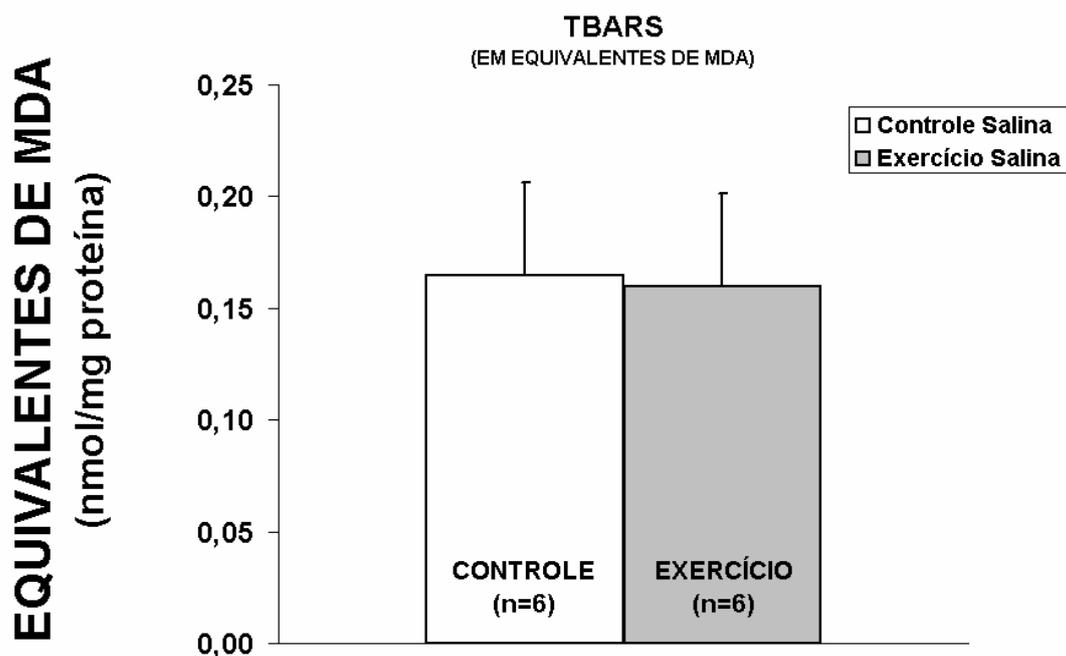


Figura 25 Conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em gastrocnêmio de animais submetidos a uma sessão de exercício agudo. Imediatamente pós o exercício, a lipoperoxidação foi estimada através da medida dos conteúdos de TBARS, indicativo da produção de malondialdeído (MDA) que acompanha a lipoperoxidação tecidual. Foi realizado teste *t* de Student não-pareados entre os controles e os exercitados e não houve diferença entre as médias.

4.4 Glicogênio muscular

Seguindo na seqüência de avaliações sobre as características do estresse a que o músculo gastrocnêmio esteve sujeito durante e após as sessões de exercício agudo, passamos às medidas do conteúdo de glicogênio. A quantidade de glicogênio no músculo gastrocnêmio vermelho (figura 26) do grupo controle foi de $2,029 \pm 0,531$ mg/100mg de tecido ($n=3$), enquanto no grupo exercício o conteúdo foi de $0,9571 \pm 0,299$ mg/100mg de tecido ($n=3$). Esta diferença, correspondendo a uma queda de 47 % no conteúdo de glicogênio muscular, foi analisada pelo teste *t* de Student pareado e considerada significativa ($p < 0,05$).

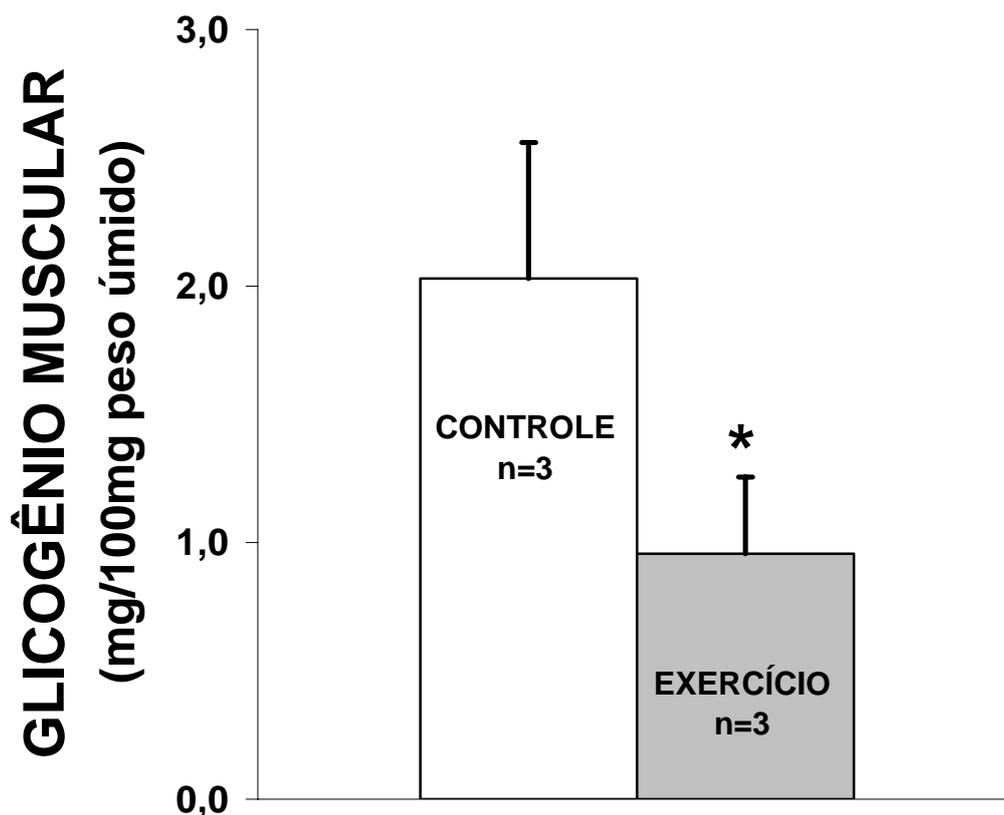


Figura 26 Conteúdo de glicogênio no músculo gastrocnêmio vermelho em mg/100mg de tecido de animais não submetidos a natação (controle) e submetidos a natação (exercício). Foi realizado teste *t* de Student não-pareado. A diferença entre as médias é significativa ($p < 0,05$).

4.5 Efeito do bloqueio da produção de óxido nítrico

4.5.1 Conteúdo de NO_x^- total

Apesar de não termos observado qualquer diferença estatística entre a expressão de HSP70 no músculo solear de animais controle em relação aos exercitados, foram realizadas avaliações comparativas entre o sóleo e o gastrocnêmio destes animais no sentido de se traçar o perfil da produção de NO através das medidas de nitratos e nitritos nestes tecidos. A figura 27 mostra, então, o perfil dos conteúdos de NO_x^- total (=

$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) no músculo solear de ratos controle e tratados com L-NAME (300 mg/kg) em situação de repouso ou imediatamente após a sessão de exercício agudo.

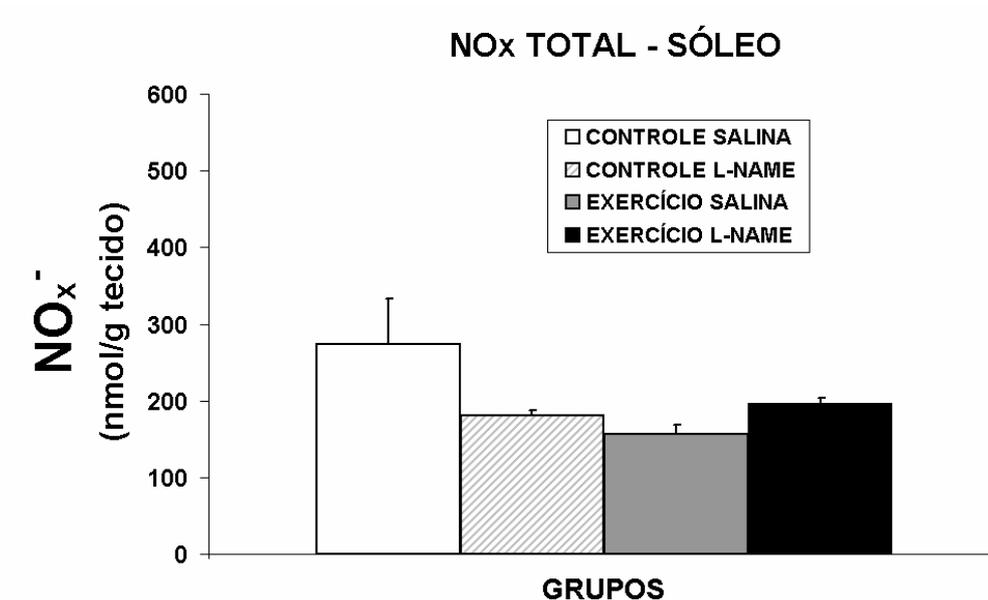


Figura 27 Conteúdo de NO_x^- total no músculo sóleo de ratos dos grupos controle-salina, exercício-salina, controle-L-NAME e exercício-L-NAME. Os dados estão expressos em termos das médias \pm E.P.M. de seis preparações experimentais diferentes. As diferenças entre as médias, com base na análise de variância (ANOVA) de duas vias, não foram consideradas significativas.

O tratamento com L-NAME não determinou uma queda na produção de NO_x^- totais. Apesar de poder ser observada uma diferença de aproximadamente 34%, essa diferença não foi estatisticamente significativa. O exercício físico parece também diminuir (43%) a quantidade de NO_x^- no sóleo destes animais, enquanto que o L-NAME aparentemente não interfere na quantidade deste metabólito quando o animal foi exercitado (figura 27). Quando comparados com os dados obtidos entre os dois tipos musculares estudados, vê-se que a quantidade de NO_x^- totais é cerca de 1,7 vezes maior no gastrocnêmio que no sóleo (figura 28). Assumindo-se que o conteúdo de NO_x^- reflete a produção tecidual de NO, pode-se dizer que o gastrocnêmio apresenta uma capacidade de produção maior que a encontrada no sóleo. Da mesma forma que para o sóleo, o

tratamento com L-NAME provocou uma redução de 37% na quantidade de NO_x^- totais, embora não estatisticamente significativa. Saliente-se ainda que, o tratamento com L-NAME pareceu levar a um incremento de cerca de 50% na quantidade do metabólito no músculo gastrocnêmio.

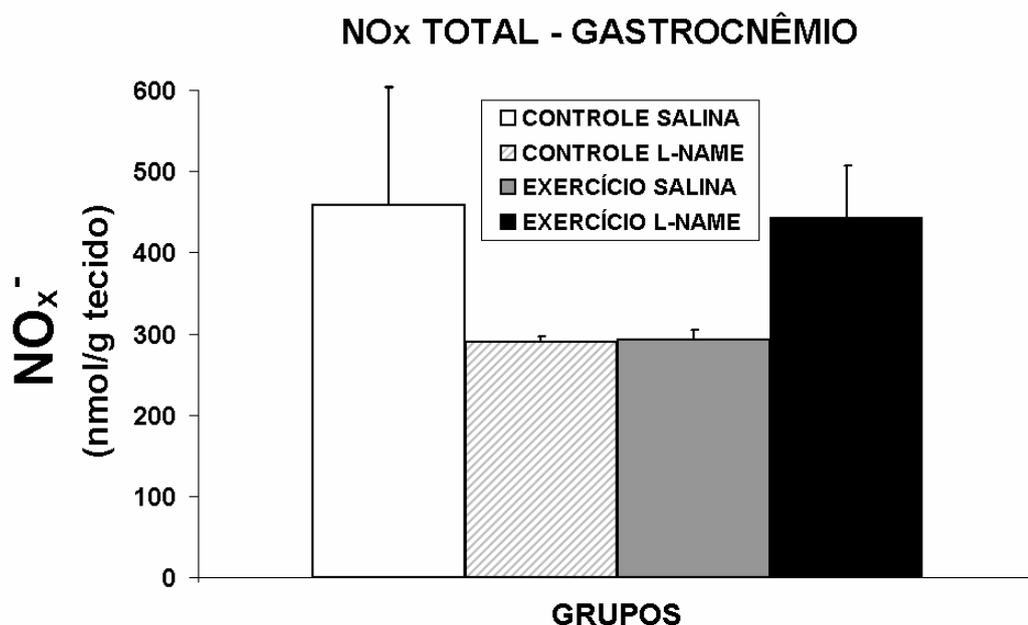


Figura 28 Conteúdo de NO_x^- total no músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos controle-salina, exercício-salina, controle-L-NAME e exercício-L-NAME. Os dados estão expressos em termos das médias \pm E.P.M. de seis preparações experimentais diferentes. As diferenças entre as médias, com base na análise de variância (ANOVA) de duas vias, não foram consideradas significativas.

4.5.2 Conteúdo de NO_2^-

Ao examinarmos os conteúdos de nitritos nos dois tipos musculares, observa-se que a produção do metabólito é cerca de 8,5 vezes maior no gastrocnêmio (figura 30) que no sóleo (figura 29). Por outro lado, enquanto o tratamento dos animais com L-NAME não fez diferença para o conteúdo de NO_2^- no sóleo, no gastrocnêmio o inibidor provocou queda de 31% (mesmo que estatisticamente não significativa). Ainda no gastrocnêmio, o tratamento com L-NAME induziu novo aumento nos conteúdos de nitrito.

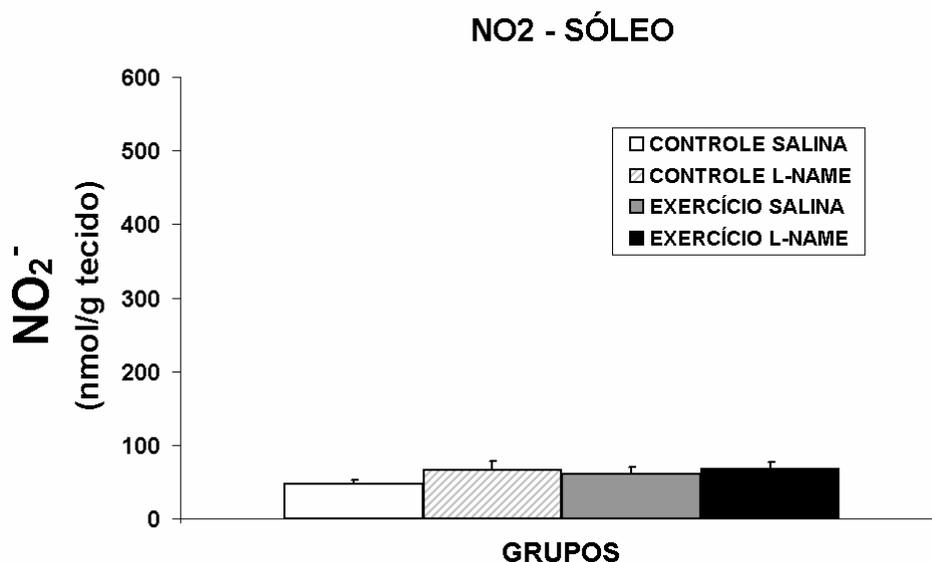


Figura 29 Conteúdo de NO₂⁻ no músculo sóleo de ratos dos grupos controle-salina, exercício-salina, controle-L-NAME e exercício-L-NAME. Os dados estão expressos em termos das médias ± E.P.M. de seis preparações experimentais diferentes. As diferenças entre as médias, com base na análise de variância (ANOVA) de duas vias, foram significativas para p<0,05.

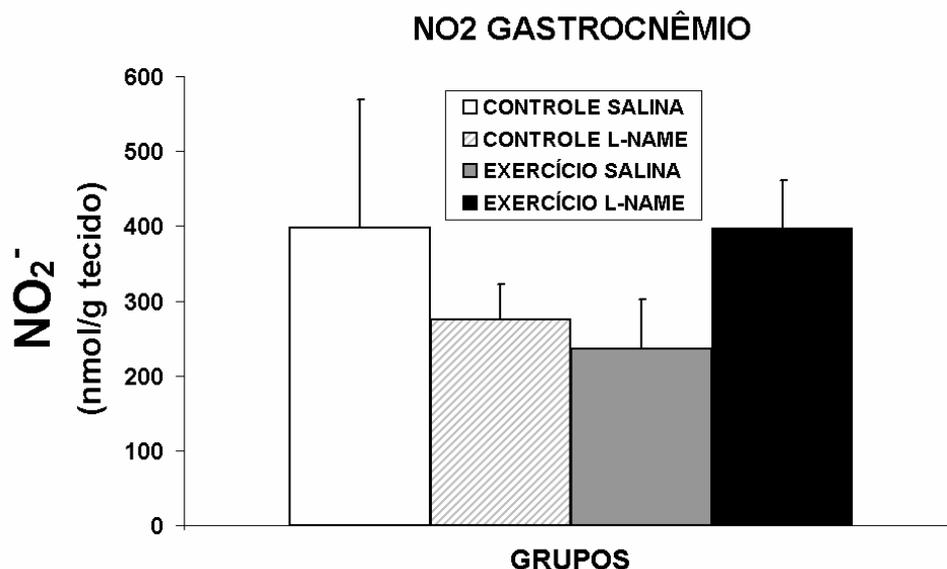


Figura 30 Conteúdo de NO₂⁻ no músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos controle-salina, exercício-salina, controle-L-NAME e exercício-L-NAME. Os dados estão expressos em termos das médias ± E.P.M. de seis preparações experimentais diferentes. As diferenças entre as médias, com base na análise de variância (ANOVA) de duas vias, não foram consideradas significativas.

4.5.3 Conteúdo de NO₃⁻

A análise dos conteúdos de NO₃⁻ nos dois tecidos revelou que o sóleo (figura 31) tem uma capacidade 4,5 vezes maior que o gastrocnêmio (figura 32) de

acumular NO_3^- , a forma mais oxidada do NO, um resultado que nos parece bastante coerente com o fato de que o sóleo é de metabolismo mais oxidativo que o músculo gastrocnêmio. Neste caso, o tratamento com L-NAME também provocou redução (significativa, $p < 0,05$ por ANOVA) de cerca de 60% no conteúdo do metabólito. Nota-se ainda que o exercício físico reduziu em 68% a quantidade de nitrato no sóleo (figura 31) e que o tratamento com L-NAME não interferiu neste resultado. Já o gastrocnêmio, cuja quantidade de nitratos foi cerca de 78% menor que no sóleo, não apresentou resposta nem ao exercício nem quanto ao tratamento com L-NAME. Tomados como um todo, esses achados sugerem que as grandes alterações no metabolismo do NO no sóleo devam refletir-se nos conteúdos de NO_3^- (forma mais oxidada), enquanto que no gastrocnêmio essas alterações refletem-se na quantidade de NO_2^- (forma mais reduzida). Vê-se ainda que, pelo menos aparentemente, a produção de NO deva ser maior (quase o dobro) no gastrocnêmio em relação ao sóleo e que apenas neste último o bloqueador L-NAME consegue inibir o acúmulo de derivados nitrogenados.

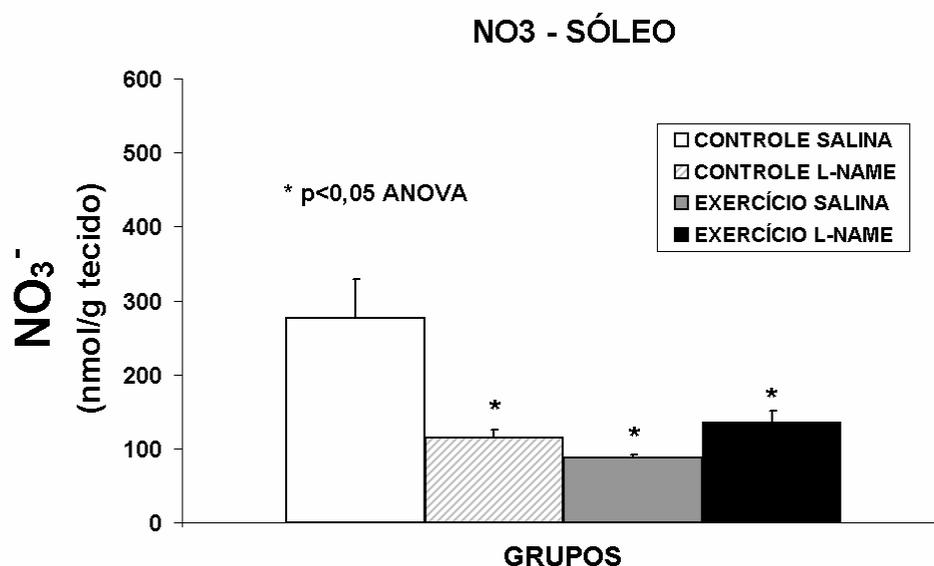


Figura 31 Conteúdo de NO_3^- no músculo sóleo de ratos dos grupos controle-salina, exercício-salina, controle-L-NAME e exercício-L-NAME (médias \pm E.P.M.; diferenças significativas para $p < 0,05$).

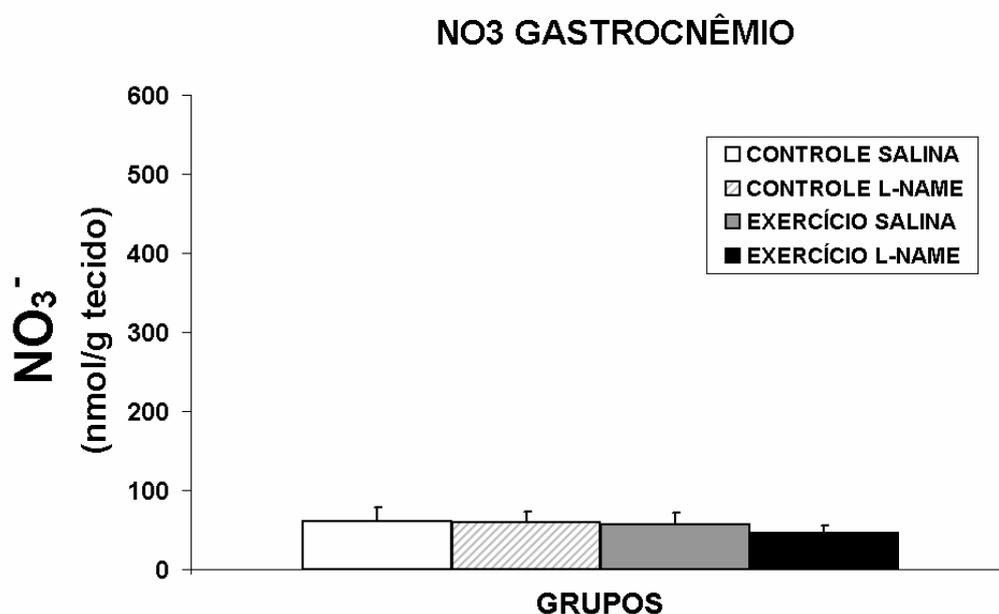


Figura 32 Conteúdo de NO₃⁻ total no músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos controle-salina, exercício-salina, controle-L-NAME e exercício-L-NAME. (médias ± E.P.M.; NS).

4.5.4 Expressão de HSP no sóleo

Apesar de não termos observado qualquer diferença estatística entre a expressão de HSP70 no músculo solear de animais controle em relação aos exercitados, investigamos a possibilidade de que esse quadro pudesse ser alterado quando da administração do bloqueador da produção de NO, o L-NAME.

A figura 33 apresenta a análise da expressão relativa de HSP70 entre os grupos controle-salina, controle-L-NAME, exercício-salina e exercício-L-NAME. Como podemos observar, aqui também não foram constatadas diferenças entre nenhum dos grupos, sugerindo que não houve efeito do exercício sobre a expressão de HSP70,

nem efeito do bloqueio da síntese de NO, seja sobre a expressão basal, seja sob o efeito do exercício.

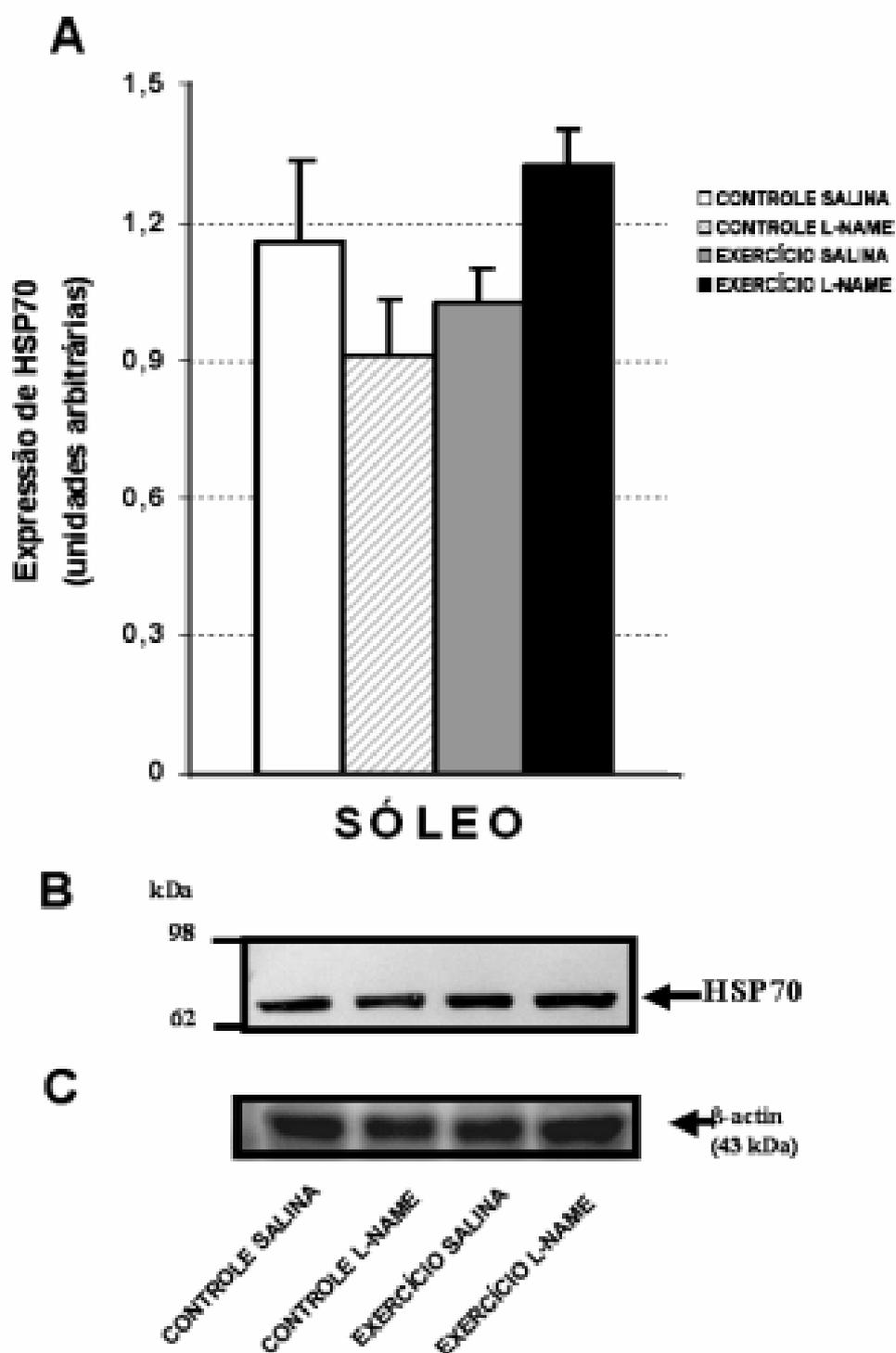


Figura 33 Expressão relativa de HSP70 no músculo sóleo de ratos dos grupos controle-salina, exercício-salina, controle-L-NAME e exercício-L-NAME (médias \pm E.P.M.; NS).

4.5.5 Expressão de HSP no músculo gastrocnêmio

O conteúdo relativo de HSP70 nos grupos controle-salina, controle-L-NAME, exercício-salina e exercício-L-NAME no gastrocnêmio dos animais está representado na figura 34, onde as letras representam diferenças significativas entre os grupos. Assim, as colunas assinaladas com a letra “a” são diferentes da coluna do grupo controle-salina, com a letra “b” da coluna do grupo controle-L-NAME, com a letra “c” da coluna do grupo controle-salina e com a letra “d” da coluna do grupo controle-L-NAME. Como podemos observar, constata-se a ausência de diferença significativa entre os grupos controle-salina e controle-L-NAME, indicando que a administração do inibidor competitivo da síntese de óxido nítrico não foi capaz de modificar o conteúdo de HSP70 em condições de repouso. Entretanto, no grupo exercício-L-NAME, o conteúdo de HSP70 foi 49,5 % menor do que o do grupo exercício-salina ($p < 0,05$), indicando que a administração do inibidor competitivo L-NAME, na dose 300 mg / kg de peso do animal, foi capaz de impedir o aumento no conteúdo de HSP70 em resposta ao estresse imposto pelo exercício. Além disso, o conteúdo de HSP70 do grupo exercício-L-NAME, também foi menor ($p < 0,05$) que o observado para os grupos controle-L-NAME (31 %) e controle-salina (33 %), sugerindo que o bloqueio da produção de NO, durante o exercício possa impedir a manutenção do conteúdo de HSP70 observado em repouso.

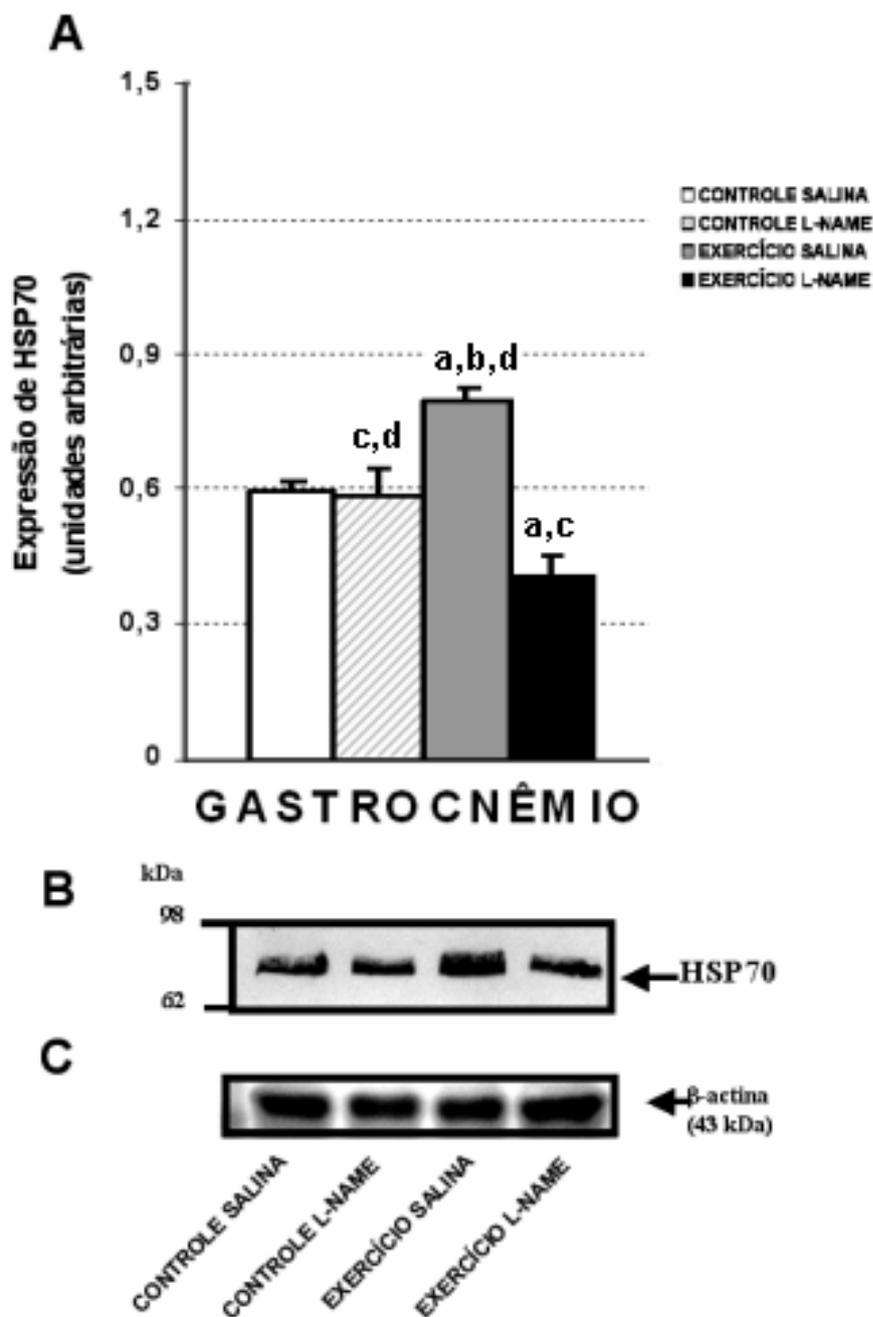


Figura 34 Expressão relativa de HSP70 no músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos controle-salina, exercício-salina, controle-L-NAME e exercício-L-NAME (médias \pm E.P.M.). As diferenças entre as médias, com base na análise de variância (ANOVA) de duas vias, foram significativas para $p < 0,05$ (indicadas por letras). Colunas indicadas pela letra “a” são diferentes da coluna do grupo controle-salina, com a letra “b” do grupo controle-L-NAME, com a letra “c” do grupo exercício-salina e com a letra “d” do grupo exercício-L-NAME. O n em cada grupo é de 3 animais

5 DISCUSSÃO

A concentração de lactato no grupo exercitado foi de $13,1 \pm 1,7$ mmol/L de sangue, o que corresponde a um aumento de 3,5 vezes acima do valor observado em repouso ($3,8 \pm 0,6$ mmol/L). Ainda que os valores de lactato de repouso estejam bem acima dos observados por outros experimentadores (TAKALA et al., 1983; GOBATTO et al., 2001), o aumento na concentração plasmática de lactato é um dado coerente e indica que o exercício foi bastante intenso (OCEL et al., 2003; GOBATTO et al., 2001). Esta elevada intensidade foi eficaz para a indução de proteínas de choque térmico. Contudo, só conseguimos observar esta resposta (indução de HSP70) no músculo gastrocnêmio enquanto que a expressão no músculo sóleo (de metabolismo mais oxidativo) não se alterou com a atividade física.

Uma explicação para essa aparente discrepância seria o padrão de recrutamento dos músculos para realização do exercício. O músculo esquelético de mamíferos adultos inclui vários subtipos especializados de fibras musculares que diferem em relação a suas capacidades metabólicas, regulação metabólica, contratilidade e suscetibilidade à fadiga. Esta diversidade das fibras musculares habilita

o músculo a atender uma grande variedade de demandas funcionais ou condições metabólicas através da reprogramação da expressão gênica para alterar suas características fenotípicas especializadas (GRANGE et al. 2001). Em grupos de músculos sinérgicos, com diferentes propriedades contráteis, aqueles que apresentam contração rápida devem ser recrutados de forma preferencial em movimentos que exigem velocidade (WAKELING, 2004). Assim, considerando que o músculo sóleo é formado basicamente por fibras de abalo lento oxidativas e resistentes a fadiga (ARMSTRONG E PHELPS, 1984), podemos afirmar que ele deve estar bem aparelhado para fazer frente a situações que exigem contrações musculares de baixa intensidade que devem ser sustentadas por longos períodos de tempo (e.g. tônus necessário para manutenção da postura corporal normal, que seria a de quatro apoios no caso do rato). Por outro lado, o gastrocnêmio vermelho é constituído principalmente por fibras de abalo rápido oxidativas com resistência intermediária à fadiga (ARMSTRONG E PHELPS, 1984). Seguindo a mesma linha de raciocínio, podemos inferir que este músculo está bem estruturado para ações eventuais, envolvendo contrações musculares de maior intensidade, mas de menor duração como saltar, correr, nadar por curtos intervalos de tempo, colocar-se na posição de dois apoios (de pé). Portanto, é possível que nosso modelo de exercício resulte em um recrutamento preferencial do gastrocnêmio, pelo sistema nervoso central. Conseqüentemente, o estresse imposto ao sóleo pelo exercício seria menor do que ao gastrocnêmio, o que explicaria as diferenças na expressão de HSP70.

Em consonância com a nossa hipótese, Milne e Noble (2002), analisando a expressão de HSP70 em resposta a um exercício de intensidade crescente (corrida em esteira, iniciando com animais que se deslocavam a uma velocidade de 15 m/min e

progredindo, com aumentos escalonados de 3 m/min, até 33 m/min) observaram que no músculo vasto vermelho da coxa, constituído predominantemente por fibras de abalo rápido oxidativas, o aumento no conteúdo de HSP70 só atingia significância em velocidade igual ou acima de 24 m/min ($P < 0,05$). No músculo vasto branco, constituído principalmente por fibras de abalo rápido glicolíticas, o conteúdo de HSP70 só se tornou significativamente diferente dos valores encontrados no controle em velocidades igual ou acima de 27 m/min. Por outro lado, o músculo sóleo, que é constituído basicamente por fibras de abalo lento, mostrou um padrão de expressão de HSP70 contrário àquele descrito para o vasto vermelho e o vasto branco. O conteúdo destas proteínas apresentou-se significativamente elevado nos animais que se deslocavam em velocidades mais baixas ($P < 0,05$), enquanto nos animais que se deslocavam a 30 m/min e acima, o conteúdo de HSP70 caiu para valores próximos aos níveis do controle.

O exercício físico induz estresse oxidativo, tendo a disponibilidade de glutathiona um papel central na proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo exercício (SEN E PACKER, 2000). Na verdade, a relação entre as duas formas de glutathiona (GSH e GSSG) dirige a “voltagem” redox da célula sendo que a relação $[GSSG]/[GSH]$ é considerada índice do estado redox celular (AKERBOON E SIES, 1981). Sob condições de aumento de estresse oxidativo na célula, os níveis de glutathiona reduzida (GSH) usualmente caem, enquanto os de dissulfeto de glutathiona (GSSG) aumentam. O sóleo, que comparado a outros músculos possui uma elevada capacidade oxidativa, também parece ter um sistema de defesa antioxidante bem desenvolvido. Além de um elevado conteúdo de glutathiona, músculos do tipo do sóleo possuem uma acentuada atividade de enzimas antioxidantes dependentes de glutathiona, como a

glutathione peroxidase, a GSSG reductase e a catalase. Laughlin et al. (1990) propuseram que, embora a atividade das enzimas antioxidantes esteja relacionada com a capacidade oxidativa do músculo, tanto em ratos controle (sedentários) como nos treinados, a atividade da catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase estão diretamente correlacionadas com o percentual de fibras oxidativas nas amostras de músculo esquelético, sugerindo que tais fibras possuam um aprimorado sistema de defesa antioxidante enzimático. Acreditamos que, por essa razão, não foi observada indução da expressão de HSP70 no sóleo dos animais agudamente exercitados.

A resposta de estresse observada, em nosso estudo, no músculo gastrocnêmio é acompanhada pela alteração de diversos fatores já relacionados com a maior expressão de HSP70. Constatamos que o estresse imposto ao músculo deve ter sido grande o bastante para induzir uma maior síntese de proteínas citoprotetoras (figura 21). Resultado semelhante, com relação à síntese de mRNA da HSP70, em biopsias obtidas do músculo vasto lateral, foi observado em humanos correndo em esteira, por 30 min, a uma intensidade correspondente ao limiar individual de lactato (PUNTSCHART et al., 1996). Sugeriu-se, também, que a fosforilação das HSPs poderia contribuir para uma maior estabilidade dessas nos músculos ativos, abrindo uma nova perspectiva para o entendimento de como a atividade contrátil na fibra muscular poderia controlar os níveis intracelulares dessas proteínas (HERNANDO E MANSO, 1997).

A relação entre a glutathione oxidada e a glutathione reduzida (GSSG / GSH), assumida universalmente como índice do estado redox celular, mostrou que o músculo gastrocnêmio vermelho dos animais do grupo natação foi submetido a um estresse oxidativo significativamente maior (houve um dramático aumento de 2,4

vezes nesta relação) que o dos animais do grupo controle. Isto sugere que o gastrocnêmio esteja submetido a um fortíssimo esquema de estresse oxidativo. Além disso, o conteúdo de glicogênio no gastrocnêmio desses animais, após o exercício, foi 53% menor ($p < 0,05$) que o observado no grupo controle. Estes dados confirmam o nível de exigência imposto pelo exercício a este grupo muscular, como já indicado para o organismo pela concentração de lactato sanguíneo. Por outro lado, não houve aumento na quantidade de TBARS no gastrocnêmio após o exercício, o que pode ser explicado pela ação preventiva da vitamina E, principal antioxidante da fase lipídica da membrana (SEN e PACKER, 2000). No entanto, apesar da vitamina E combater efetivamente a cadeia de reações de lipoperoxidação, ela própria é oxidada. Portanto, a reciclagem de sua forma oxidada a vitamina E é fundamental para seu papel funcional (SEN e PACKER, 2000). A capacidade da vitamina E em proteger as membranas submetidas a condições adversas extremas pode ser explicada pela sua contínua reciclagem. É bem estabelecido que GSH pode tanto quimicamente, quanto enzimaticamente, reduzir dihidroascorbato a ascorbato (MAY et al. 1996), que por sua vez garante a reciclagem da vitamina E. Assim, a glutathiona reduzida (GSH) e o dihidrolipoato garantem a recuperação do poder antioxidante das vitaminas C e E (SEN e PACKER, 2000). Portanto, estes devem ser os mecanismos de defesa que impedem a elevação dos níveis de TBARS. Na verdade, inúmeros estudos mostram que a lipoperoxidação avaliada pelo método do TBARS (em equivalentes de MDA) depende da duração e da intensidade do estímulo estressante e do momento em que se coletam as amostras de músculo para a determinação desses metabólitos (ARSLAN et al., 2001; KAYATEKIN et al., 2002; JAMMES et al., 2005).

Para verificar a hipótese de que o sistema de geração de óxido nítrico deve estar envolvido na ativação da síntese de HSP70, nós estudamos os efeitos de um inibidor da síntese de NO sobre a síntese de HSP70.

Nossos resultados mostram que a administração de L-NAME determinou a neutralização do efeito do exercício sobre o conteúdo de HSP70 no músculo gastrocnêmio. Como o inibidor da síntese de NO foi administrado 20 min antes do exercício, é possível que a produção de NO esteja bloqueada no período de esforço e imediatamente após, sendo o possível efeito deste bloqueio observado 6 h depois da sessão de exercício.

A análise da concentração de nitratos e nitritos em homogenatos de músculo esquelético mostrou que o gastrocnêmio produz quase o dobro de NO em relação ao sóleo, o que pode estar refletindo uma maior expressão das NO sintases ou mesmo uma menor taxa de destruição (por espécies ativas do oxigênio, como o ânion superóxido) através de sua conversão em outras espécies reativas, como o peroxinitrito.

Em relação ao efeito do bloqueador de NO sintases, L-NAME, a análise da quantidade de nitratos e nitritos medidos nos dois músculos, observamos que tanto sóleo quanto gastrocnêmio são sensíveis ao tratamento, mas apenas na condição de repouso. Em ambos os tecidos foi observada queda da ordem de 35% na quantidade de NO_x^- totais, o que reflete, essencialmente, queda equivalente de nitratos no sóleo e de nitritos no gastrocnêmio. Chama a atenção também o fato de que, em repouso, a quantidade de nitratos no sóleo foi cerca de 4,5 vezes maior que a encontrada no gastrocnêmio, enquanto que a quantidade de nitritos, ao contrário, foi aproximadamente 8,5 vezes maior no gastrocnêmio que o sóleo. Como o gastrocnêmio possui, em relação ao sóleo, uma proporção menor de fibras oxidativas (SEN AND PACKER, 2000). Este

resultado sugere que, no gastrocnêmio, um meio menos oxidativo favorece a formação de NO_2^- , enquanto que no sóleo, um meio mais oxidativo favorece a formação de NO_3^- . Embora a melhor maneira de se avaliar a produção de NO seja a medida da produção “online” de NO gasoso (com o uso de eletrodos específicos), a mensuração de nitratos e nitritos é internacionalmente aceita como sendo diretamente proporcional à produção de NO.

Como o aumento na expressão de HSP70 induzido pelo exercício no gastrocnêmio (Fig. 16), por outro lado, foi inibida pela administração i.p. de L-NAME, é possível que o NO tenha tido algum importante papel na elevação da concentração de HSP70 observada no grupo exercício-salina, em relação ao grupo controle-salina. Entretanto, devido à complexidade da ação do NO e as espécies reativas do oxigênio, produzidos continuamente no músculo esquelético, sobre a contração, o metabolismo, o fluxo sanguíneo e a expressão gênica das fibras musculares (REID, 2001; KOBZIK et al. 1994) e os dados relativos à produção de NO pelo tecido muscular, tornam a análise deste resultado bastante complexa.

Hernando e Manso (1997) sugerem que o exercício (corrida em esteira para ratos) deflagra uma resposta de estresse generalizada nos músculos esqueléticos e outros tecidos (miocárdio e fígado), provavelmente desencadeada pelo NO liberado pelo endotélio nos diversos leitos vasculares, em função do aumento sistêmico de pressão. Dessa forma, o NO produzido pelas eNOS seria o elo entre a reação de alarme do sistema nervoso simpático e a resposta de estresse em nível celular (HERNANDO E MANSO, 1997). No entanto, nossos resultados no músculo sóleo não corroboram para esta hipótese, uma vez que a concentração de HSP70 no músculo sóleo no grupo exercício-salina não aumentou em relação ao controle-salina, como também não foi

observada diferença entre os grupos exercício-L-NAME e controle-L-NAME. O fato do músculo esquelético expressar, constitutivamente, a isoforma 1 das óxido nítrico sintases (NOS1), a qual se localiza junto ao sarcolema e é preferencialmente expressa nas fibras de abalo rápido (KOBZIK et al. 1994), sugerem uma efeito mais localizado do NO.

Em acordo com a idéia de um efeito localizado do NO, Malyshev et al. (1995) observaram que os mesmos agentes podiam ativar tanto a síntese de HSP70, quanto a de NO. Segundo eles, na adaptação do organismo ao estresse, a ativação da síntese de HSP70 nos órgãos ocorre proporcionalmente a quantidade de NO gerada nestes mesmos órgãos, e apontam que uma situação similar é observada na resposta inflamatória (tanto o conteúdo de NO como o de HSP70 aumentam no foco da inflamação).

Segundo Malyshev et al. (1995), apesar do óxido nítrico estar relacionado com o aumento da síntese de HSP70 observado no coração e no fígado, este não é o único fator estimulador da síntese desta proteína. A conclusão deste autor (MALYSHEV et al. 1995) decorre do fato de que o inibidor da síntese de NO não ter conseguido abolir completamente o aumento na síntese de HSP70. No nosso estudo, por outro lado, os resultados apontam para uma queda significativa do conteúdo de HSP70, associada com um aumento nos conteúdos de nitratos no sêro e de nitritos no gastrocnêmio de animais exercitados (mas não no repouso), em resposta à administração de L-NAME. Isto levanta duas questões: primeiro, que mecanismo está envolvido na ativação das óxido nítrico sintases pelo exercício? e segundo, quais os mecanismos

envolvidos no aumento da síntese de HSP70 relacionada com a maior produção de NO pela óxido nítrico sintase?

Como o exercício físico potencia a geração de radicais livres no organismo, um provável alvo intracelular para estes radicais livres seria o NF- κ B, fator de transcrição para muitos genes, incluindo os que codificam a NOS induzível (iNOS). Como consequência teríamos um aumento da atividade aumentada das óxido nítrico sintases e, conseqüentemente, uma concentração aumentada de radicais livres. Segundo Malyshev et al. (1995), tem sido demonstrado que o choque térmico resulta em uma elevação das catecolaminas e da concentração dos hormônios e, conseqüentemente, em um aumento do conteúdo intracelular de Ca^{2+} . Portanto, como o exercício físico está associado a um aumento nas catecolaminas, outro mecanismo da síntese potencializada de NO no choque térmico pode estar relacionada com a ativação da isoforma eNOS, dependente de Ca^{2+} (MALYSHEV et al., 1995)

Até o presente existem poucos dados substanciando o mecanismo pelo qual o NO poderia ativar a síntese de proteínas de estresse. Curran et al. (apud Malyshev, 1995) mostraram que o NO suprime, de forma reversível, a síntese de albumina e fibrinogênio no hepatócito, o que sugere que o NO influencia seletivamente a síntese de proteínas de estresse. Um possível princípio da expressão seletiva de genes pelo NO pode ser exemplificado pelo controle da expressão do gene SoxR. Esta última é presumivelmente possibilitada pela interação do NO com proteínas de transcrição contendo ferro não-heme. Desde que é sabido que a expressão dos genes soxR e HSP70 é induzida pelo estresse oxidativo, não pode ser excluído que a ativação de ambos os genes seja mediada pela interação do NO com uma proteína de transcrição contendo

ferro. Também é possível que o NO ative a síntese de HSP70 indiretamente, através de modificações da pressão arterial. Por exemplo, sabe-se que o choque térmico deve provocar uma queda na pressão arterial, a qual parece ser consequência de um aumento maciço na geração de NO. Por outro lado, existem evidências de que alterações na pressão arterial podem ativar a síntese de proteínas de estresse. Esses pontos estão sendo estudados em nosso laboratório através da utilização de ratos hipertensos no modelo de Goldblatt GII (dois rins, um clipe) para que se possa esclarecer a questão.

Os precisos mecanismos de inter-relação entre NO e ativação a síntese de HSP70 permanecem não esclarecidos. Entretanto, independente da natureza do mecanismo, o fato estabelecido neste trabalho é que o NO está realmente envolvido na síntese de proteínas de estresse.

É dado destaque para o fato de que o aumento na expressão do gene de HSP72 ocorreu tardiamente durante o exercício, quando a disponibilidade de glicogênio estava reduzida a baixos níveis. Foi demonstrado anteriormente que uma redução na disponibilidade de glicose é capaz de induzir uma resposta de estresse e os dados de Febbraio e Koukoulas são consistentes com a hipótese de que a expressão do gene de HSP aumenta nos músculos ativos, durante o exercício, quando a disponibilidade de glicose está comprometida (FEBBRAIO E KOUKOULAS, 2000).

Somados às informações disponíveis na literatura, nossos dados sugerem a possibilidade de que o NO seja o indutor da citoproteção muscular induzida pela expressão de HSP70. No entanto, estudos pormenorizados com investigação da expressão das três isoformas conhecidas das NO sintases, bem como de sua atividade

(catalítica) e expressão de mRNA (massa e meia-vida do mRNA) são necessários para alcançarmos plenamente os objetivos proposto no início deste trabalho.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados e tendo em vista as informações disponíveis a partir de outros estudos, podemos concluir que:

- 1) O exercício de natação com uma sobrecarga de 5 % do peso corporal preso ao animal foi capaz de aumentar o conteúdo de HSP70 no músculo gastrocnêmio, porção vermelha;
- 2) Este aumento, induzido pelo exercício, no conteúdo de HSP70 está associado com lactato e estresse oxidativo, depleção de reservas energéticas (glicogênio) e maior produção de NO pelos músculos;
- 3) A administração de L-NAME foi capaz de impedir o aumento no conteúdo de HSP70 induzido pelo exercício, sugerindo que o NO seja um importante mecanismo de indução destas proteínas em resposta ao exercício.

Apesar de nossos estudos sugerirem que o NO seja uma das vias de sinalização que levam às adaptações do músculo esquelético ao exercício, através da indução da resposta de estresse, estudos envolvendo a análise da expressão das três isoformas conhecidas das NO sintases, bem como de sua atividade (catalítica) e expressão de mRNA (massa e meia-vida do mRNA) são necessários para que alcancemos os objetivos proposto no início deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. AKERBOOM, T. P. M. AND SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology*, **77**: 373-82, 1981.
2. AMIN, J., ANANTHAN, J. AND VOELLMY R. Key features of heat shock regulatory elements. *Molecular and Cellular Biology*, **8**: 3761-3769, 1988.
3. ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES, L.E.; TUFIK, S. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP, 2004. 167 fl
4. ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*, **113**: 548-55, 1985.
5. ARMSTRONG RB AND PHELPS RO. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *American Journal of Anatomy*, **171**: 259-272, 1984
6. BUEGE J.A. AND AUST S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, **52**: 302-310, 1978.
7. CLANTON TL; ZUO L; KLAWITTER P. Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **222**(3):253-62, 1999.
8. CLARKSON P.M., SAYERS, S.P. Etiology of exercise-induced muscle damage. *Canadian Journal of Applied Physiology*. **24**(3): 234-48, 1999.

9. COYLE, E.F. Physical activity as a metabolic stressor. *American Journal of Clinical Nutrition*. **72**(2 Suppl): 512S-20S, 2000.
10. DEL AGUILA, L.F. KRISHNAN, R.K., ULBRECHT, J.S., FARRELL, P.A., CORRELL, P.H., LANG, C.H., ZIERATH, J.R., KIRWAN, J.P. Muscle damage impairs insulin stimulation of IRS-1, PI 3-kinase and Akt-kinase in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **279**(1): E206-E212, 2000.
11. DRAPER H.H., SQUIRES E.J., MAHMOODI H., WU J., AGARWAL S., HADLEY M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free radical biology and medicine*, **15**: 353-363, 1993.
12. ELIA, G. AND SANTORO, M. G. Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells. *Biochemical journal*, **300**: 201-209, 1994.
13. ESSIG, D.A. AND NOSEK, T.M. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: A dual function of reactive oxygen species? *Canadian Journal of Applied Physiology*, **22**(5): 409-428, 1997.
14. ESSIG, D.A., BORGER, D.R., JACKSON D.A. Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA in skeletal muscle following contractions. *American Journal of Physiology*, **272**(1 Pt 1): C59-C67, 1997.
15. FEBBRAIO, M.A. AND KOUKOULAS, I. HSP70 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *Journal of Applied Physiology*, **89**(3): 1055-1060, 2000.
16. FEHRENBACH, AND. AND NIESS, A.M. Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exercise Immunology Review*. **5**: 57-77, 1999.
17. FEHRENBACH, AND., PASSEK, F., NIESS, A.M., POHLA, H., WEINSTOCK, C., DICKHUTH, H.H., NORTHOFF, H. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **32**(3): 592-600, 2000.
18. GAVIN, T.P., SPECTOR, D.A., WAGNER, H. BREEN, E.C., WAGNER, P.D. Nitric oxide synthase inhibition attenuates the skeletal muscle VEGF mRNA response to exercise. *Journal of Applied Physiology*, **88**(4), 1192-1198, 2000.

19. GOBATTO, C.A., MELLO, M.A.R., SIBUYA, C.Y., AZEVEDO, J.R.M., SANTOS, L.A., KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology*, **130**: 21-27, 2001.
20. GONZALEZ B., HERNANDO, R., MANSO, R. Stress proteins of 70 kDa in cronicly exercised skeletal muscle. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*. **440**(1): 42-49, 2000.
21. GRANGE, R.W., MEESON, A., CHIN, E., LAU, K.S., STULL, J.T., SHELTON, J.M., WILLIAMS, R.S., GARRY, D.J. Funcional and molecular adaptations in skeletal muscle of myoglobin-mutant mice. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, **281**(5): C1487-C1494, 2001.
22. GRANGER, D.L.; TAINTOR, R.R.; BOOCKVAR, K.S.; HIBBS JR., J.B. Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with Griess reaction. *Methods (A companion to Methods in Enzymology)*, **7**: 78-83, 1995.
23. GROSS, S.S., WOLIN, M.S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annual Review of Physiology*,. **57**:737-769, 1995.
24. HAMMOND, G.L., LAI, Y.K. LAI, AND MARKERT, C.L. Diverse forms of stress lead to new patterns of gene expression through a common and essential metabolic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**:3485-3488, 1982.
25. HERNANDO, R., MANSO, R. Muscle fibre stress in response to exercise: synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. *European Journal of Biochemistry*, **243** (1-2): 460-467, 1997.
26. JACKSON MJ. Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation? *Proceedings of Nutrition Society*, **58**(3): 673-676, 1999.
27. KOBZIK, L.; REID, M.B.; BREDET, D.S; STAMLER, J.S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, **372**: 546-548, 1994.
28. KOLBERG, A. ROSA, T.G. PULH, M.T. SCOLA, G. JANNER, D.R. LAGRANHA, D.J. MASLINKIEWICZ, A. HECK, T.G. CURI, R. HOMEM DE BITTENCOURT, JR. P.I. Low expression of MRP/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumor-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer

- immunodeficiency. *Cell Biochemistry and Function*, **23**: 1-17, 2005. (Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1027/cbf.1290)
29. LAUGHLIN MH, SIMPSON T, SEXTON WL, BROWN OR, SMITH JK, KORTHUIS RJ. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *Journal of Applied Physiology*, **68**: 2337–2343, 1990.
 30. LEEUWENBURGH, C. HANSEN, P.A., HOLLOSZY, J.O., HEINECKE, J.W. Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free radical biology and medicine*, **27**(1-2): 186-92. 1999.
 31. LOCKE, M. AND NOBLE, E.G. Stress proteins: The exercise response. *Canadian Journal of Applied Physiology*, **20**(2): 155-167, 1995.
 32. LOCKE, M., NOBLE, E.G. AND ATKINSON, B.G. Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. *American journal of physiology*, **261** (Cell Physiol. 30): C774-C779, 1991.
 33. LOWRY, O. H.; ROSENBOUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-75, 1951.
 34. MALYSHEV, I. Y.; MANUKHINA, E. B.; MIKOYAN, V.D.; KUBRINA, L.N.; VANIN A. F. Nitric oxide is involved in heat-induced HSP70 accumulation. *FEBS Letters*, **370**: 159-162, 1995.
 35. MANNERVIK, B. AND GLUTHENBERG, C. Glutathione transferase. *Methods in Enzymology*, **77**: 231-235, 1981.
 36. MANNERVIK, B. Glutathione peroxidase *Methods in Enzymology*, **113**: 490-495, 1985.
 37. MAY J.M.; QU Z.C.; WHITESELL R.R.; COBB, C.E. Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free radical biology and medicine*, **20**: 543–551, 1996.
 38. MEYER, T.N. AND DA SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. *Revista da Associação Médica Brasileira*, **45**(2): 181-188, 1999.
 39. MILNE, K.J. and NOBLE, E.G. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *Journal of Applied Physiology*, **93**: 561-568, 2002.

40. MINOWADA, G., WELCH W.I. Clinical implications of the stress response. *Journal of Clinical Investigation*. **95**: 3-12, 1995.
41. NIESS, A.M., DICKHUTH, H.-H., NORTHOFF, H. Free radicals and oxidative stress in exercise-immunological aspects. *Exercise Immunology Review*. **5**: 22-26, 1999.
42. NOBLE, E.G., MORASKA, A., MAZZEO, R.S., ROTH, D.A., OLSSON, M.C., MOORE, R.L., FLESHNER, M. Differential expression of stress proteins in rat myocardium after free wheel or treadmill run training. *Journal of Applied Physiology* **86**(5): 1696-1701, 1999.
43. OCEL, J.V., MILLER, L.E., PIERSON, L.M.; WOOTTEN, D.F.; HAWKINS, B.J.; MYERS, J; HERBERT, W.G. Adaptation of Pulmonary Oxygen Consumption Slow Component Following 6 Weeks of Exercise Training Above and Below the Lactate Threshold in Untrained Men. *Chest*, **124**: 2377 – 2383, 2003.
44. PAROO, Z., NOBLE E.G. Isoproterenol potentiates exercise-induction of HSP70 in cardiac and skeletal muscle. *Cell Stress Chaperones*, **4**(3): 199-204, 1999.
45. PAROO, Z., TIIDUS, P.M., NOBLE, E.G. Estrogen attenuates HSP70 expression in acutely exercised male rodents. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, **80**(3): 180-184, 1999.
46. PUNTSCHART, A.; VOGT, M.; WIDMER, H.R.; HOPPELER, H.; BILLETER, R. HSP70 expression in human skeletal muscle after exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*, **7**: 411-417, 1996.
47. RADAK Z; KANEKO T; TAHARA S; NAKAMOTO H; OHNO H; SASVARI M; NYAKAS C; GOTO S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology and Medicine*, **27**(1-2): 69-74, 1999.
48. RADEGRAN G; HELLSTEN Y. Adenosine and nitric oxide in exercise-induced human skeletal muscle vasodilatation. *Acta Physiologica Scandinavica*, **168**(4): 575-91, 2000.
49. REID, M.B. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, **33**(3): 371-376, 2001.
50. RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, **13**: 571-573, 1962.

51. SALO, D.C., DONOVAN, C. M. AND DAVIES, K.J. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, **11**: 239-246, 1991.
52. SAMELMAN, T.R. Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. *Experimental Physiology*, **85**(1): 92-102, 2000.
53. SANTORO, M. G.; AMICI, C.; ELIA, G.; BENEDETO, A.; GARACI, E. Inhibition of virus protein glycosylation as the mechanism of the antiviral action of prostaglandin A in Sendai virus-infected cells. *Journal of General Virology*, **70**: 789-800, 1989b.
54. SANTORO, M. G.; GARACI, E.; AMICI, C. Prostaglandins with antiproliferative activity induce the synthesis of a heat shock protein in human cells. *Proceedings of National Academic Science*, **86**: 8407-8411, 1989a.
55. SANTORO, M.G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*, **59**: 55-63. 2000.
56. SEN and PACKER. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, **72**(2), 2000.
57. SILVEIRA, L.R. e DENADAI, B.S. Efeito modulatório de diferentes intensidades de esforço sobre a via glicolítica durante o exercício contínuo e intermitente. *Revista Paulista de Educação Física*, **16**: 186-197, 2002.
58. VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry*, Bethesda **11**, 1965.
59. VESELEY MJ; EXON DJ; CLARK JE; FORESTI R; GREEN CJ; MOTTERLINI R Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells; hemin and sodium nitroprusside are regulators *in vitro*. *American Journal of Physiology*, **275**(4 Pt1): C1087-94, 1998.
60. WAKELING, J.M. Motor units are recruited in a task-dependent fashion during locomotion. *Journal of Experimental Biology*, **207**(22): 3883-3890, 2004.
61. WELCH, W.J. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiological reviews*, **72**: 1063-1081, 1992.
62. WENDEL, A. Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, **77**: 325-33, 1981.