



## 5º Congresso de Pesquisa

### **CARACTERIZAÇÃO DA LESÃO MUSCULAR (APOPTOSE OU NECROSE) NO MÚSCULO RE RATO: FRENTE AO EXERCÍCIO FÍSICO INTENSO E A RESPOSTA DE DEFESA E REPARO**

#### **Autor(es)**

ROZANGELA VERLENGIA

#### **Apoio Financeiro**

FAPESP, FAP/UNIMEP

#### **1. Introdução**

Diversos estudos têm verificado a relação dos exercícios físicos agudos e crônicos na expressão das enzimas de choque térmico (heat shock proteins-HSPs) em resposta à lesão muscular (SMOLKA et al, 2000; NAITO et al, 2001; SCHNEIDER et al, 2002; DEMIREL et al, 2003; THOMPSON et al, 2003; ATALAY et al, 2004). Nesse contexto, as HSP têm mostrado um papel relevante no mecanismo de reparo das células musculares em resposta a prática do exercício físico extenuante (PAULSEN et al., 2007). As HSPs 72 e 73 inicialmente denominadas de HSP70, estão localizadas tanto no citoplasma quanto no núcleo das células (HERENDEEN, 1979). A forma constitutiva (HSP73) é sintetizada em células não estressadas de mamíferos e somente é aumentada após episódios de estresse (CHONG, 1998). Enquanto a forma induzível (HSP72) apresenta níveis baixos em células não estressadas, quase não detectáveis, porém quando exposta ao estresse, aumenta rapidamente e em grande quantidade (DONATI, 1990). As HSP72 e as HSP73 contribuem para a prevenção contra a agregação protéica, ajudam no desdobramento de proteínas danificadas, assumem o papel de chaperonas nos polipeptídeos nascentes dos ribossomos, auxiliam na remoção das proteínas danificadas e estão envolvidas na proteção celular frente a uma variedade de estresse (CHIANG, 1989; ANGELIDIS, 1991; CRAIG, 1991; WELCH, 1992; CYR, 1995; ZIETARA, 1995; LOCKE, 1997; MOSSER, 1997). Segundo Liu et al. (2006); fatores como: acúmulo de Ca<sup>2+</sup>; acoplamento elétrico-mecânico; depleção do glicogênio; depleção de adenosina-trifosfato; acidose e acúmulo de lactato; espécies reativas do oxigênio; ação de mensageiros (cortisol e Interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa) e alterações temperatura (hipertermia e hipotermia), encontram-se relacionados com regulação da HSP-72. Por outro lado, estes têm sido são descritos frente à exercícios físicos extenuantes (SALO, et al., 1991; HARRIS e STARNES, 2001; NAITO et al., 2001; MILNE e NOBLE, 2002 e PAULSEN et al., 2007).

#### **2. Objetivos**

Determinar o conteúdo protéico da 72 no músculos sóleo ratos após uma sessão de exercício agudo, até a

exaustão, de baixa-moderada intensidade nos intervalos de tempos, imediato (0); 1; 2; 4 e 8 horas), pela técnica de Western-Blotting.

### 3. Desenvolvimento

3.1. Animais Foram usados 40 roedores Wistars machos, fornecidos pelo biotério da UNICAMP, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 em cada), ambiente com temperatura de 24°C e ciclo claro/escuro controlado de 12 horas. Os animais receberam água e ração comercial (NUVILAB CR1, NUVTAL Nutrientes LTDA, Curitiba, PR) ad libitum. Este estudo integra parte do projeto temático intitulado Caracterização da lesão muscular (apoptose ou necrose) no músculo de ratos frente ao exercício físico intenso e a resposta de defesa reparo aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas I da Universidade de São Paulo (USP), sob o no de 49/04.

3.2. Protocolo de exercício Antes do início do experimento (corrida em esteira ergométrica) os animais foram adaptados a andar na esteira com uma velocidade de 13m/min durante cinco minutos por um mês. Em seqüência os animais foram colocados na esteira com velocidade e inclinação progressiva até atingirem 21 m/min, permanecendo até a exaustão, momento em que os animais não conseguiam manter-se correndo. Para a caracterização da intensidade do exercício no momento da exaustão, o lactato sanguíneo, de 17 ratos foi determinado conforme descrito por Gobatto et al, (2001). A concentração de lactato foi determinada utilizando o analisador de lactato YSI (modelo 1500 SPORT).

3.3 Obtenção das amostras biológicas Para a obtenção dos músculos sóleo anestesiados com sódio thiopental (25 mg/kg, i.p.) e posteriormente sacrificados por meio de guilhotina e o músculo obtido, nos intervalos de imediato (0), 1, 2, 4 e 8 horas, após o término do exercício. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento das análises.

3.4. Análise da expressão protéica Análise das proteínas de choque térmico (HSP-72) foi realizada por Western Blotting. Os passos de extração da proteína e a separação eletroforética das mesmas foram processadas conforme descrito por Lima et al. (2006). As proteínas imobilizadas nos géis foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo Anticorpo Policlonal Anti-HSP70 de coelhos (Stressgen - Bioreagents - /Canadá Victotia) (DEMIREL, 2003). Para a detecção usou-se a IgG de coelho anti-rato conjugada HRP (Stressgen – Bioreagents - / Canadá Victoria), visualizado com sistema de detecção ECL. HRP-conjugated (Horse Radish Peroxidase) anti-IgG. Os anticorpos foram detectados por autoradiografia, usando filme fotográfico Kodak XAR film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY). As intensidades das bandas foram quantificadas através da leitura da autoradiografia com o programa Scion Image.

3.5 Quantificação das proteínas totais A quantificação das proteínas totais foi analisada por meio do reagente BRADFORD – BioAgency – Biotecnologia – São Paulo/Brasil (BRADFORD, 1976). 3.6 – Estatística

Para análise estatística, foram realizadas One-Way ANOVA, seguido pelo teste Tukey post hoc, usando o programa GraphPad Prism, version 4.0, for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). O nível de significância foi de  $p < 0,05$ . Os resultados foram apresentados em Erro Padrão da Média (EPM).

### 4. Resultados

4.1. Detreminação do lactato sanguíneo As concentrações de lactato sanguíneo apresentaram valores médios de  $4,80 \pm 0,40$  mmol/L no momento da exaustão, sendo a cinética de recuperação da lactacidemia considerada normal. Redução de 48% dos valores pós esforço foram observados após 20 minutos do término do protocolo de corrida (Figura 1). O valor de lactato sanguíneo em repouso foi de  $1,97 \pm 0,08$  mmol/L. 4.2 Determinação do conteúdo de proteína HSP72 no músculo Sóleo. Quando comparados os

dados obtidos em relação ao controle um aumento de 184% foi observado no período de 4 horas (Figura 2).  
Discussão

Os dados obtidos por nós, mostraram que o exercício de leve e moderada intensidade pode induzir aumento da síntese da proteína HSP-72. Similarmente aos nossos dados de aumento, embora a intensidade do exercício não tenha sido discutida, Melni e Noble (2002) encontraram um rápido aumento do conteúdo proteico da HSP-72 entre as velocidades de 15 à 27 m/min com 2% de inclinação da esteira para o músculo sóleo, porém 24 horas após 60 minutos do término da corrida. SMOLKA et al. (2000), avaliando a HSP-72 e marcadores do estresse oxidativo encontraram aumentos significativos para HSP72 após 2 horas do exercício exaustivo, bem como diminuição da atividade das enzimas catalase e glutathione redutase e aumento dos derivados de carbonil reativo indicando uma relação entre a resposta da HSP e o estresse oxidativo. Aumento significativo da citrato sintase apontam para a execução de exercício de alta resistência.

## 5. Considerações Finais

---

De modo geral, o exercício físico de diferentes intensidades podem promover alteração na expressão da HSP-72, porém os parâmetros que induzem a alteração destas proteínas em exercícios de baixa e moderada intensidade tais como: metabolitos; hormônias, energéticos etc.. devem ser melhores investigados. Agradecemos à cooperação das Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho e a Profa. Profa. Dra. Luciana Chagas Caperutto na execução dos experimentos e a FAPESP e ao FAP-UNIMEP pelo apoio financeiro

## Referências Bibliográficas

---

ANGELIDIS, C.; LAZARIDIS, I.; PAGOULATOS, G. Constitutive expression of heat shock protein in mammalian cells confers thermotolerance. **Eur. J. Biochem.**, 199: 35-39, 1991.

ATALAY, M.; OKSALA, N. K.; LAAKSONEN, D. E.; KHANNA, S.; NAKAO, C.; LAPPALAINEN, J.; ROY, S.; HANNINEN, O.; SEN, C. K. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. **J. Appl. Physiol.**, 97 (2): 605-11, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254, 1976.

CHIANG, H. L.; TERLECKY, S.; PLANT, C.; DICE, J. A role for 70 kDa heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular protein. **Science.**, 246: 382-385, 1989.

CHONG, K. Y.; LAI, C. C.; LILLE, S.; CHANGE, C. and SU, C. Y. Stable overexpression of the constitutive form of heat shock protein 70 confers oxidative protection. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, 30: 599-608, 1998.

CRAIG, E. A.; GROSS, C. A. Is hsp70 the cellular thermometer? **Trends Biochem. Sci.**, 16: 135-140, 1991.

CYR, D. Cooperation of the molecular chaperone YDJ1p with specific HSP70 homologs to suppress protein aggregation. **FEBS Lett.**, 29: 29-34, 1995.

- DEMIREL, H. A.; HAMILTON, K. L.; SHANELY, R. A.; TUMER, N.; KOROLY, M. J.; POWERS S. K. Age and attenuation of exercise-induced myocardial HSP72 accumulation. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, 285 (4): H1609-15, 2003.
- DONATI, Y. R. Y.; SLOSMAN, D. O.; POLLA, B. S. Oxidative injury and the heat shock response. **Biochim. Pharmacol.**, 40: 2571-2577, 1990.
- GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R.; SANTOS, L. A.; KOKOBUM, E. Maximal lactate steady state in rats submitted in swimming exercise. **Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.**, 130 (1): 21-27, 2001.
- HARRIS, M. B.; STARNES, J. W. Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, 280: 2271–2280, 2001.
- HERENDEEN, S. L.; VAN BOGELEN, R.A. and NEIDHARDT, F. C. Levels of major protein of Escherichia coli during growth at different temperatures. **J. Bacteriol.**, 132: 255-258, 1979.
- LIMA, M.H.; SOUZA, L.C.; CAPERUTO, L.C.; Bevilacqua, E.; GASPARETTI, A.L.; ZANUTO, R.; SAAD, M.J.; CARVALHO, C.R. Up-regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in the ovary of rats by chronic treatment with hCG and insulin. **J. Endocrinol.**, 190(2): 451-459, 2006.
- LIU, Y.; GAMPERT, L.; NETHING, K.; STEINACKER, J.M. Response and function of skeletal muscle heat shock protein 70. **Front. Biosci.**, 11: 2802-2827, 2006.
- LOCKE, M. The cellular stress response to exercise: role of stress protein. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, 25: 105-136, 1997.
- MILNE, K.J.; NOBLE, E.G.. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. **J. Appl. Physiol.**, 93: 561-568, 2002.
- MOSSER, D.; CARON, A.; BOURGET, L.; DENIS-LAROSE, C. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. **Mol. Cell Biol.**, 17: 5317-5327, 1997.
- NAITO, H.; POWERS, S. K.; DEMIREL, H. A.; AOKI, J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, 33(5):729-734, 2001
- PAULSEN, G.; VISSING, K.; KALHOVDE, J.M.; UGELSTAD, I.; BAYER, M.L.; KADI, F.; SCHJERLING, K.; HALLÉN, J.; RAASTAD, T. Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 292(2): R844-853, 2007.

SALO, D. C.; DONOVAN, C. M.; DAVIES, K. J. A. HSP70 and other possible heat shock protein or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heat, and liver during exercise. **Free Radic. Biol. Med.**, 11:239-246, 1991.

SCHNEIDER, E. M.; NIESS, A. M.; LORENZ, I.; NORTHOFF, H.; FEHRENBACH, E. Inducible hsp70 expression analysis after heat and physical exercise: transcriptional transcriptional, protein expression, and subcellular localization. **Ann. N.Y. Acad. Sc.**, 973: 8-21, 2002.

SMOLKA, M. B.; ZOPPI, C. C.; ALVES, A. A.; SILVEIRA, L. R.; MARANGONI, S.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, D. V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 279 (5): R1539-1545, 2000.

THOMPSON, H. S.; MAYNARD, E. B.; MORALES, E. R.; SCORDILIS, S. P. Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. **Acta Physiol. Scand.**, 178 (1): 61-72, 2003.

WELCH, W. J. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress protein and implication for medicine and disease. **Physiol. Rev.**, 72: 1063-1081, 1992.

ZIETARA, M.; SKORKOWSKI, E. Thermostability of lactate deshydrogenase LDH-A4 isozyme: effect of heat shock protein DnaK on the enzyme activity. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, 27:1169-1174, 1995.

## Anexos

---

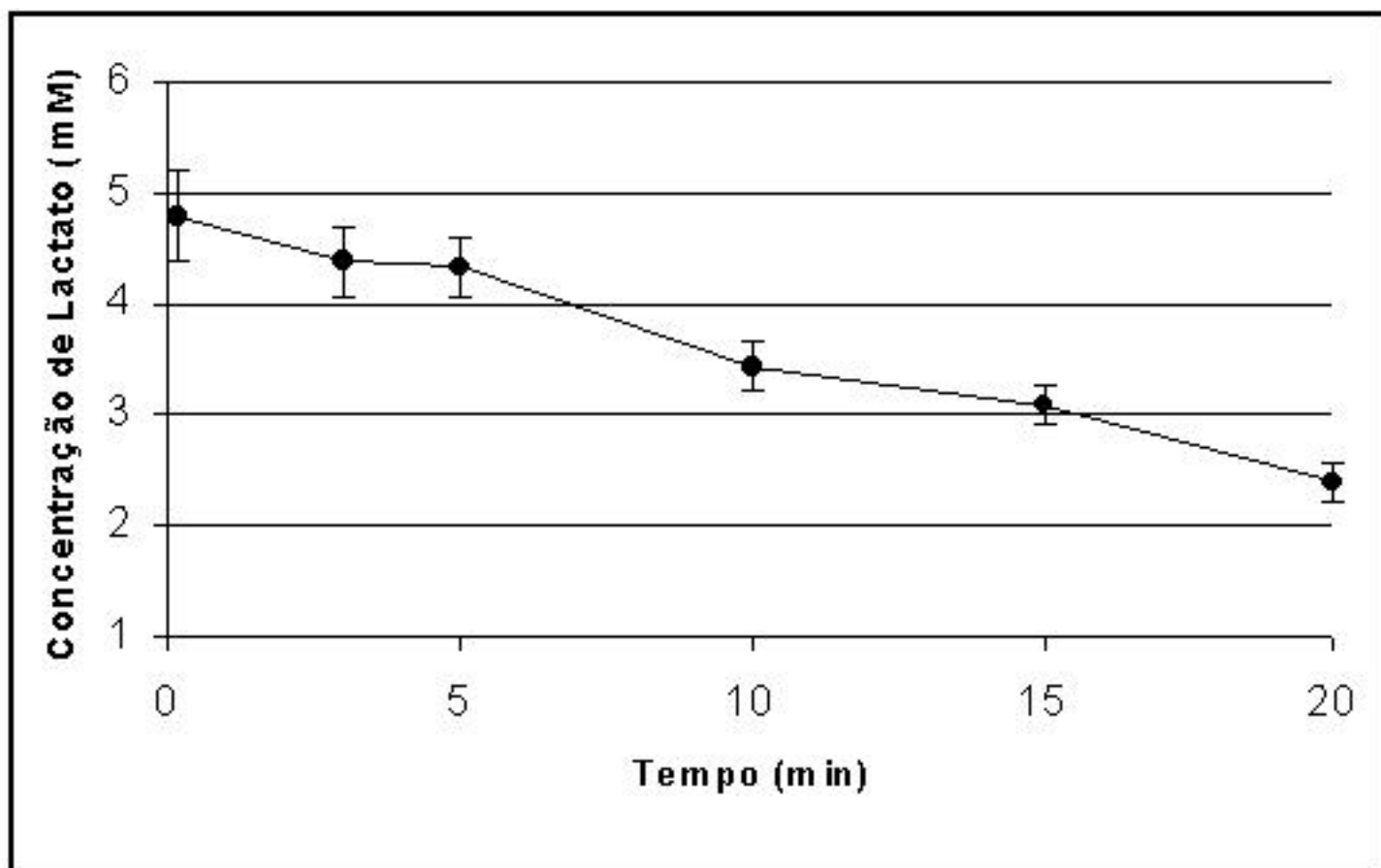


Figura 1 – Cinética da concentração do lactato sanguíneo obtidos nos períodos imediato, 3, 5, 10, 15 e 20 minutos após o término do protocolo de exercício proposto. Os valores são expressos em  $\pm$  Erro padrão da média de três determinações.

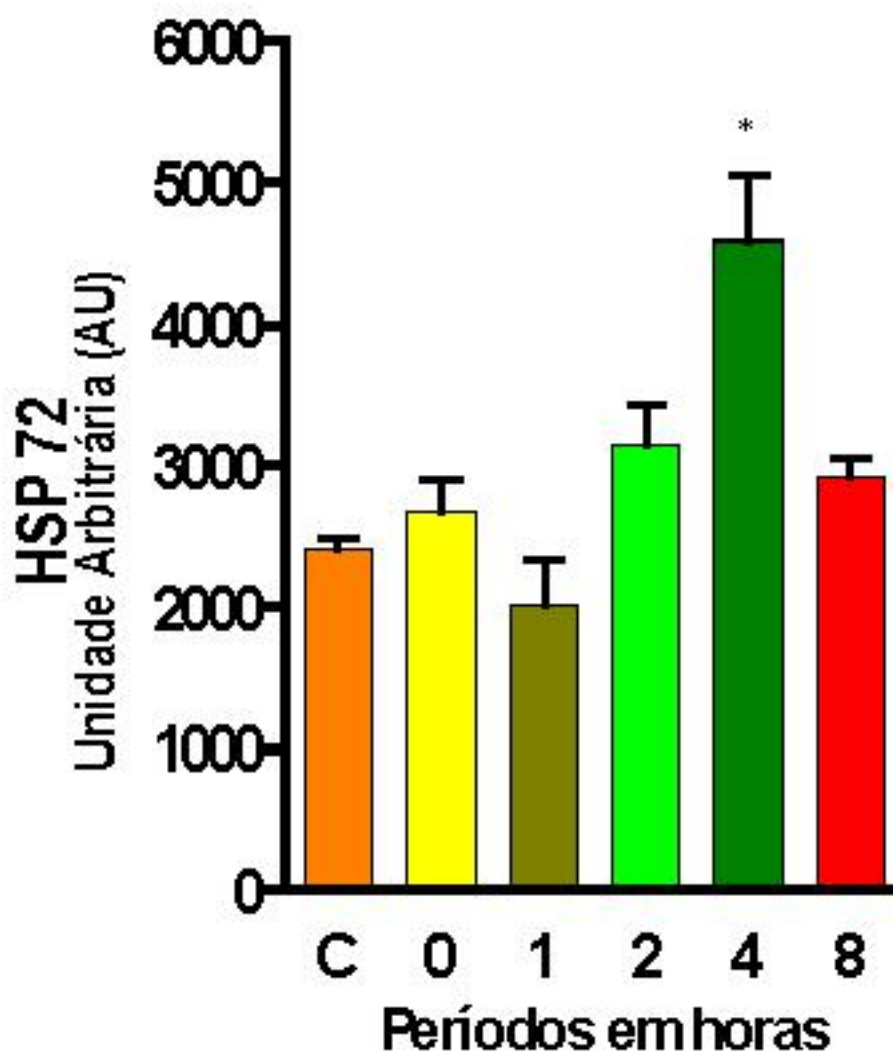


Figura 2: Efeito do exercício físico de baixa-moderada intensidade sobre o conteúdo proteico da HSP72 no músculo sóleo, obtidos em diferentes períodos após a exaustão imediata: 1, 2, 4 e 8 horas. \* análise foi realizada por *Western Blotting* conforme