

***Exercício físico e expressão da
proteína de estresse HSP72 em
músculos de ratos submetidos a
diferentes tipos de treinamentos***

MARCUS BUSTAMANTE SMOLKA

**TESE DE MESTRADO
1999**

Exercício físico e expressão da proteína de estresse HSP72 em músculos de ratos submetidos a diferentes tipos de treinamentos

MARCUS BUSTAMANTE SMOLKA

ORIENTADOR

Prof. Dr. José Camillo Novello
Departamento de Bioquímica – I.B.
UNICAMP

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em
Ciências Biológicas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas, área de concentração em
Bioquímica.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)
Marcus Bustamante Smolka
e aprovada pela Comissão Julgadora.
10/02/99

CAMPINAS, SP - 1999

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	
T. DADO DE	37420
PROD	229/99
C	☐
D	☒
PROD	R\$ 11,00
DATA	28/04/99
N.º CPD	

CM-00122786-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP

Smolka, Marcus Bustamante

Sm1e

Exercício físico e expressão da proteína de estresse HSP72 em músculos de ratos submetidos a diferentes tipos de treinamentos/ Marcus Bustamante Smolka. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.
73f: ilus.

Orientador: José Camillo Novello

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Exercício físico. 2. Músculo. 3. Proteína. I. Novello, José Camillo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 10 de fevereiro de 1999

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Prof. Dr. José Camillo Novello (Orientador)

José Camillo Novello
Luiz E. S. Netto

Prof. Dr. Luís Eduardo Soares Netto

Prof. Dr. Rui Curi

Rui Curi

SUPLENTE:

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Camillo Novello pela oportunidade, orientação e companheirismo.

À Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo pela coorientação, ótimas discussões, amizade e, principalmente, pela chance de trabalho em conjunto.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni e ao Prof. Dr. Benedito Oliveira Filho pela oportunidade e apoio.

À Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva pela atenta revisão desta Tese.

Ao Prof. Dr. Luís Eduardo Soares Netto pelas proveitosas discussões e pelo anticorpo policlonal contra TrPx.

Aos amigos Paulo Baldasso e Ricardo Lima Braga pelo apoio técnico.

À todos os integrantes do Laboratório de Química de Proteínas e do Laboratório de Bioenergética pelo auxílio e companheirismo.

Ao Sr. Marciano de Oliveira pelo anticorpo monoclonal contra HSP72.

À minha família pelo carinho e atenção tão preciosos a mim dedicados.

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

A presente Tese também foi desenvolvida sob a supervisão da Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo do Depto. de Bioquímica (I.B., UNICAMP).

ÍNDICE

ABREVIACÕES	i
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	2
GRUPO DE TRABALHO ENVOLVIDO	3
INTRODUÇÃO	4
PLASTICIDADE MUSCULAR.....	5
BIOQUÍMICA DO MÚSCULO	6
RESPOSTA AO ESTRESSE.....	14
OBJETIVOS.....	21
MATERIAIS E MÉTODOS	22
RESULTADOS.....	31
PARTE I: Ajustes metodológicos.....	32
PARTE II: Caracterização dos músculos.....	35
PARTE III: Efeito dos treinamentos e do exercício intenso na quantidade de HSP72 dos músculos sóleo e semitendinoso.....	41
ANEXO: Outros resultados do grupo.....	47
DISCUSSÃO	52
PARTE I: Ajustes metodológicos.....	53
PARTE II: Caracterização dos músculos.....	54
PARTE III: Efeito dos treinamentos e do exercício intenso na quantidade de HSP72 dos músculos sóleo e semitendinoso.....	56
PERSPECTIVAS.....	65
TRABALHOS EM CONGRESSOS E PUBLICAÇÕES.....	66
BIBLIOGRAFIA.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Vias de formação de EROs no músculo esquelético	8
FIGURA 2: Diferentes níveis de organização do músculo esquelético	11
FIGURA 3: Mecanismo de ativação transcricional das HSPs.....	18
FIGURA 4: Procedimento de preparação de amostra	26
FIGURA 5: Análise da estabilidade de proteínas.....	33
FIGURA 6: Teste de reprodutibilidade da preparação de amostra	34
FIGURA 7: Separação e quantificação das isoformas de CPM	35
FIGURA 8: Perfil eletroforético total de proteínas dos músculos.....	36
FIGURA 9: Western blot para detecção de TrPx.....	37
FIGURA 10: Western blot para detecção da HSP72.....	38
FIGURA 11: 2D-PAGE de proteínas totais do músculo sóleo	39
FIGURA 12: Ampliação da figura 11	40
FIGURA 13: Efeito dos treinamentos na quantidade de HSP72 do sóleo	42
FIGURA 14: Efeito dos treinamentos na quantidade de HSP72 do semitendinoso	43
FIGURA 15: Efeito do protocolo de exercício intenso na quantidade de HSP72 do sóleo	45
FIGURA 16: Efeito do protocolo de exercício intenso na quantidade de HSP72 do semitendinoso .	46
FIGURA 17: Correlação entre os níveis de expressão de HSP72 e as razões CS/GR e CS/CAT...	50

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Protocolos de treinamento contínuo e intermitente.....	23
TABELA 2: Protocolo de exercício intenso.....	24
TABELA 3: Isoformas de CPM predominantes e capacidade oxidativa relativa dos músculos.	35
TABELA 4: Atividade das enzimas citrato sintase, catalase e glutathione redutase	48

ABREVIATÓES

ATP: adenosina 5'-trifosfato

CAT: catalase

CS: citrato sintase

CPM: cadeia pesada de miosina

DIA: músculo diafragma

DTT: ditioneitol

EDL: músculo extensor digital longo

EROs: espécies reativas de oxigênio

GR: glutathione redutase

HSE: elemento de choque térmico

HSF: fator de choque térmico

HSP: proteína de choque térmico

hsp: gene de choque térmico

kDa: kilodalton

PE: proteína de estresse

PVDF: polivinilideno difluoreto

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SOL: músculo sóleo

ST: músculo semitendinoso

TC: treinamento contínuo

TI: treinamento intermitente

TrPx: tioredoxina peroxidase

2D-PAGE: eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida

RESUMO

O músculo é um tecido dotado de grande plasticidade, isto é, tem a capacidade de alterar suas características bioquímicas e funcionais para melhor se adaptar frente a variados estímulos. O exercício físico pode promover estímulos que induzem adaptações no sistema de produção de energia, no sistema de defesa antioxidante e no sistema miofibrilar. Porém, se os estímulos forem muito intensos, as miofibrilas podem estar sendo submetidas a uma condição prejudicial de estresse.

O estresse gerado resulta, molecularmente, na rápida produção de proteínas de estresse, que teriam funções de preservar células (no caso miofibrilas) do impacto nocivo e prepará-las para a sobrevivência na nova condição. No músculo, a proteína de estresse HSP72 é uma das principais proteínas envolvidas neste processo de rápida proteção à variados tipos de estresses (Welch, 1992; Locke et al., 1994; Hernando e Manso, 1997).

Os resultados do presente trabalho indicam que após um exercício intenso, ratos sedentários apresentam um aumento dos níveis de HSP72 nos músculos locomotores sóleo (oxidativo) e semitendinoso (glicolítico). Ratos submetidos a programas de treinamento do tipo contínuo e intermitente de 8 semanas não apresentam aumento dos níveis de HSP72 após o mesmo exercício intenso à que foram submetidos os sedentários, sugerindo que as adaptações promovidas pelos treinamentos tomaram os músculos em questão mais resistentes ao estresse causado pelo exercício.

Os dados quando confrontados com análises de atividade dos marcadores dos sistemas oxidante (citrato sintase) e antioxidante (catalase e glutathione redutase), indicam que quanto maiores os níveis de HSP72, maior a atividade da citrato sintase (CS) em relação à da catalase (CAT) e glutathione redutase (GR).

Partindo da premissa de que a HSP72 tem marcante atividade de proteção e reparo de proteínas e de que quanto maior a atividade da CS em relação à da CAT e GR maiores os efeitos deletérios do estresse oxidativo, a HSP72 poderia representar um mecanismo de proteção adicional utilizado pelo músculo esquelético contra os efeitos do estresse oxidativo nas proteínas. Os dados também sugerem que, além de atuar no mecanismo de rápida proteção, a HSP72 parece estar envolvida em mecanismo constitutivo de defesa contra o estresse oxidativo.

Esses resultados reforçam a idéia da utilidade da HSP72 como biomarcador de condições de estresse no músculo. No caso de exercício físico intenso, sua presença em altos níveis parece indicar uma situação de estresse oxidativo.

SUMMARY

Muscle is a tissue with high plasticity, that is, it can change its biochemical and functional characteristics to better cope with different stimulus. Exercise can provide stimulus that induce adaptations in the energy generating, antioxidant defense and myofibrillar systems. But, if the stimulus are too intense, myofibrils can be submitted to a stressful condition.

The generated stress results, on a molecular level, in a fast production of stress proteins. These proteins have cellular protective functions and appears to be involved in the preparation of cells to survival in the new condition. In the muscle, the stress protein HSP72 is one of the main proteins involved in this mechanism of fast protection against different types of stress (Welch, 1992; Locke et al., 1994; Hernando e Manso, 1997).

The results of the present work indicate that after intense exercise, sedentary rats show an increase of HSP72 levels in the locomotory muscles soleus (oxidative) and semitendinous (glicolytic). Rats submitted to continuous and intermittent training programs of 8 weeks do not show increased HSP72 levels after the same intense exercise, suggesting that the adaptations resulted from the training program increased muscle resistance to exercise stress.

When compared to markers of the oxidant and antioxidant systems, the results indicate that the higher the HSP72 levels, higher is the activity of citrate synthase (CS) in relation to that of catalase (CAT) and glutathione reductase (GR).

It is suggested that HSP72 could represent a secondary defense against protein damage induced by oxidative stress in skeletal muscles. This is supported by the fact that HSP72 has activity of protecting and repairing proteins, and that the higher the CS activity in relation to CAT and GR activity, higher should be the deleterious effects of the oxidative stress. Moreover, this mechanism appears to function not only in stressful conditions but also constitutively.

This work indicate the usefulness of HSP72 as a biomarker of stress conditions in the muscle. In the case of exercise, high HSP72 levels coincide with oxidative stress conditions.

GRUPO DE TRABALHO ENVOLVIDO

Esta Tese está diretamente associada com o trabalho desenvolvido pelo grupo coordenado pela Profa. Dra. Denise Vaz Macedo do Laboratório de Bioenergética do mesmo departamento. O grupo de trabalho estabelecido teve o objetivo de padronizar as técnicas para monitorar vários marcadores bioquímicos nos músculos de ratos submetidos a dois tipos de treinamentos diferentes, amplamente empregados na prática desportiva. Deste modo, o trabalho foi dividido da seguinte forma:

- Padronização da técnica e análise de marcadores do metabolismo aeróbico e do sistema enzimático de defesa antioxidante: Cláudio Cesar Zoppi;
- Padronização da técnica e análise de marcadores do sistema miofibrilar: Guilherme Antonio Pires de Oliveira;
- Padronização da técnica e análise da expressão de HSP72: Marcus Bustamante Smolka.

Este planejamento possibilitou que vários biomarcadores pudessem ser monitorados ao longo do mesmo treinamento. A padronização e execução dos experimentos é trabalho com nível de complexidade impossível de ser realizado, em larga escala, por uma pessoa só em curto espaço de tempo (devido à grande quantidade de músculos analisados e à relativa dificuldade das técnicas empregadas).

Assim, ao final dos dois protocolos de treinamento, que compreenderam 8 semanas consecutivas, os dados obtidos puderam ser correlacionados uns aos outros, permitindo interpretações mais completas e conclusivas dos resultados.

No anexo: “Outros resultados do grupo de trabalho”, esta tese fará referência direta aos dados obtidos pelo grupo. Os outros integrantes do grupo, em suas respectivas teses, também farão referência aos resultados deste trabalho.

INTRODUÇÃO

Os músculos esqueléticos são tecidos dinâmicos que podem alterar suas características fenotípicas proporcionando uma melhor adaptação funcional frente a variados estímulos. Dentre os importantes fatores determinantes das características musculares pode-se ressaltar o tipo de inervação, hormônios atuantes, atividade contrátil e condição de alongamento (Gunning e Hardeman, 1991; Goldspink et al., 1992; Staron e Johnson, 1993). As características musculares mudam à medida que estes determinantes se alteram. Desta forma, uma fibra muscular inicialmente adaptada à contração rápida, se devidamente estimulada, pode passar a exibir características de fibra de contração lenta (Pette e Vrbova, 1992).

É conhecido que o treinamento físico à resistência pode promover importantes adaptações musculares e que o exercício produz uma série de condições adversas às fibras musculares ao mesmo tempo que induz à adaptação. De grande interesse é a idéia de que muitos dos sinais à adaptação possam estar diretamente relacionados aos estresses gerados.

Para combater os efeitos deletérios destes estresses, existem mecanismos de proteção caracterizados, principalmente, pela rápida síntese de proteínas do grupo das HSPs ("Heat Shock Proteins") com funções de proteção e reparo de proteínas (Locke et al., 1990; Welch, 1992; Hernando e Manso, 1997). A função destas proteínas em preservar as células do estresse e prepará-las para sobreviver a vários tipos de desafios sugere que estas proteínas possam ter função relevante em mediar a resposta adaptativa do músculo esquelético ao exercício físico (Hernando e Manso, 1997).

Seguir-se-á uma descrição sobre a bioquímica muscular, focalizando-se os sistemas de produção de energia e espécies reativas de oxigênio, de defesa antioxidante e de contração (miofibrilar), e como estes podem ser alterados num treinamento de exercício físico. Em seguida, será abordado o mecanismo de proteção contra os estresses, focalizando-se no grupo das HSPs.

Os diferentes músculos apresentam grande diversidade de características fenotípicas. As propriedades contráteis, e consequentemente a eficiência e economia de gasto energético de um músculo podem ser alteradas durante um treinamento à resistência. Ao nível molecular, além de diferenças nas isoformas das proteínas miofibrilares (geradoras de força) presentes, variações existem na forma de produção de energia e no sistema de defesa antioxidante.

Como os músculos têm grande capacidade de adaptação, é interessante referir-se às características momentâneas dos músculos como estado adaptativo. As principais características diferenciais de dois músculos em estados adaptativos opostos são (Goldspink, 1996):

(1) Músculo de contração rápida:

fenótipo: branco;

funcionalidade: movimentos rápidos de grande força e pouco repetitivos;

fonte de energia: carboidratos;

forma de produção de energia: glicolítica (anaeróbica);

fibra predominante: tipo IIb;

defesa antioxidante: baixa.

(2) Músculo de contração lenta:

fenótipo: vermelho;

funcionalidade: movimentos lentos e repetitivos (por exemplo, músculos posturais);

fontes de energia: carboidratos e lipídios;

forma de produção de energia: oxidativa (aeróbica);

fibra predominante: tipo I;

defesa antioxidante: alta.

A maioria dos músculos estão em estados adaptativos intermediários, apresentando características “híbridas”. Por exemplo, um músculo pode apresentar capacidade de produzir energia aeróbica e anaerobicamente.

Sistema gerador de energia e espécies reativas de oxigênio (EROs)

O exercício muscular se baseia na conversão da energia de ligação química para a energia mecânica. A energia para contração muscular é provinda do ATP, deste modo, a forma de gerar ATP tem implicação direta no tipo de movimento efetuado pelo músculo. Na respiração aeróbica o rendimento do processo é grande, sendo bastante ATP gerado por molécula de glicose ou ácido graxo. Porém, este processo é lento e, consequentemente, é possível manter as contrações por longos períodos desde que o esforço não seja alto (não exija muita energia). Músculos que precisam realizar muita força utilizam predominantemente o sistema anaeróbico de produção de

energia, pois este é capaz de produzir grande quantidade de ATP, rapidamente. Neste último caso, o problema é que é inviável manter a força por períodos longos devido à rápida depleção das reservas (pois o rendimento do processo é muito baixo) e pelo efeito tóxico tóxico do ácido láctico produzido (Sjodin et al., 1990; Goldspink, 1996).

Um treinamento à resistência promove aumento da capacidade oxidativa dos músculos esqueléticos em uso. É observado um aumento na capilarização e no número de mitocôndrias, além de alterações na economia de gasto ATP e composição de isoformas de proteínas contráteis e regulatórias. As adaptações promovidas são fisiologicamente benéficas para melhorar a capacidade do músculo para o metabolismo aeróbico e, assim, prolongar a performance ao exercício submáximo (Hood et al., 1992).

Durante o mecanismo de produção de ATP pelas mitocôndrias, a citocromo oxidase participa como catalisador final da reação de redução tetravalente do oxigênio molecular a água, sem a formação de intermediários de oxigênio. Foi calculado que este processo redutor representa cerca de 95 a 98% do oxigênio total consumido pelas células. Entretanto, uma pequena fração (2 a 5%) deste oxigênio pode ser reduzido univalentemente, principalmente pela coenzima Q reduzida (Sjodin et al., 1990), dando início à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Ernster, 1986; Naqui et al., 1986). Estas incluem um amplo espectro de espécies radiculares como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila ($\cdot OH$) e não radiculares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Numa situação de exercício, o $O_2^{\cdot-}$ pode ser formado no músculo de várias maneiras (Figura 1) (Hess e Manson, 1984; Sjodin et al., 1990; Janssen et al., 1993):

- i) na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, principalmente quando esta se encontra reduzida (numa situação de anóxia muscular) e é reoxigenada pelo oxigênio durante, por exemplo, a pausa após um esforço de alta intensidade. A coenzima Q, uma quinona presente na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, pode ser reduzida univalentemente a semiquinona por elétrons provindos de NADH ou succinato, na presença do complexo multienzimático NADH-coenzima Q redutase ou da succinato desidrogenase. Estas semiquinonas podem reduzir, univalentemente, o O_2 a $O_2^{\cdot-}$;
- ii) pela enzima xantina oxidase (ativada em situação de baixo ATP e alto AMP). Em condições normais, a enzima xantina desidrogenase catalisa as reações de oxidação da hipoxantina a xantina e da xantina a ácido úrico, utilizando NAD como receptor de elétrons. Durante exercício intenso ou isquemia, esta enzima é convertida a xantina oxidase, que catalisa as mesmas reações, porém utilizando oxigênio molecular como receptor de elétrons, o que resulta na geração de EROs;

iii) adicionalmente, as enzimas NADPH oxidase e citocromo P450 oxidase também podem produzir EROs, porém parecem não representar sítios produtores tão potentes quanto aos citados nos itens i e ii.

O músculo esquelético também produz óxido nítrico a partir de arginina e oxigênio numa reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (Kobzik et al., 1994; Reid, 1996). O óxido nítrico pode reagir com O_2^- para formar peroxinitrito, um intermediário instável que pode se decompor em um poderoso oxidante com reatividade similar ao radical hidroxila (Beckman et al., 1990). Além disso, a presença de ferro (na forma livre ou ligado a heme) pode converter o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, pela reação de Haber-Weiss, em radical hidroxila, uma das EROs mais reativas (Hess e Manson, 1984; Herbert et al., 1994).

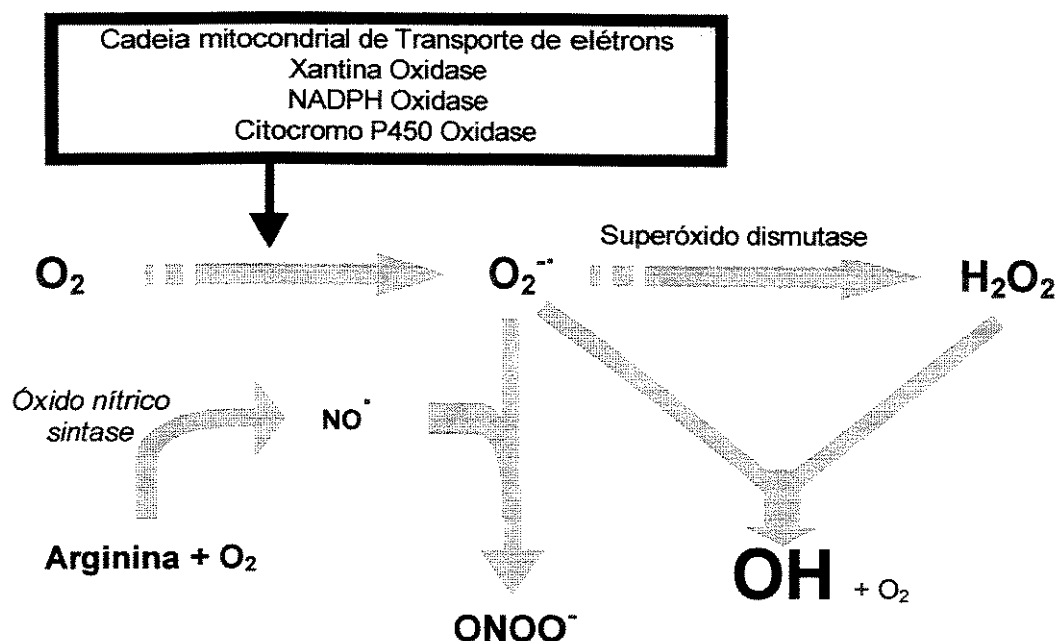


FIGURA 1: Vias de formação de EROs no músculo esquelético. Explicação detalhada pode ser encontrada no texto das páginas 7 e 8. O_2 : oxigênio; O_2^- : radical ânion superóxido; $OH^\bullet$: radical hidroxila; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; $NO^\bullet$: óxido nítrico; $ONOO^-$: ânion peroxinitrito (modificado de Essig e Nosek, 1997).

Como são espécies altamente reativas, algumas reagem com estruturas celulares, produzindo outras espécies radiculares, desencadeando assim um dano oxidativo. Os alvos mais importantes das EROs são:

- i) Membranas celulares e intracelulares, com o início e a propagação da peroxidação lipídica (Sjodin et al., 1990);

- ii) Proteínas, cuja oxidação induz a um ataque proteolítico (Stadtman, 1992);
- iii) Moléculas de DNA (nuclear e mitocondrial), com aparecimento de modificações nas bases e quebras e/ou ligações cruzadas com proteínas, muitas vezes irreversíveis (Imlay e Linn, 1988; Halliwell e Gutteridge, 1990).

Modificações em proteínas causadas por EROs incluem alterações em amino ácidos, aumento de hidrofobicidade, desnaturação parcial e formação de ligações cruzadas covalentes (Giulivi et al., 1994). Tais modificações podem resultar em perdas da atividade catalítica e marcam enzimas a serem degradadas por proteases citosólicas, como o complexo multicatalítico denominado proteassomo (Levine et al., 1981; Stadtman, 1992; Pacifici et al., 1993). Deste modo, estresse oxidativo pode aumentar proteólise intracelular por modificar proteínas celulares (Grune et al., 1995).

Sistema de defesa antioxidante

Os radicais livres não constituem um problema enquanto os mecanismos naturais de controle estiverem funcionando eficientemente. Radicais livres são desativados por atividade enzimática e por antioxidantes naturais que limitam a formação inicial de radicais, a formação durante as reações em cadeia ou reparam os danos resultantes (Sen, 1995).

O sistema de defesa antioxidante é constituído principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e glutathione redutase (GR). Além disso, moléculas sequestradoras de espécies radicalares, tais como ascorbato (vitamina C), glutathione reduzida (GSH), cisteína e α -tocoferol (vitamina E), embora ofereçam proteção menos específica, também limitam o dano total às células (Halliwell e Gutteridge, 1990). Assim, embora fisiologicamente todas as células aeróbicas gerem espécies radicalares, as abundantes defesas antioxidantes dos organismos “saudáveis” tendem a prevenir o dano celular causado por EROs.

Aparentemente, os radicais livres são uma necessidade e uma influência positiva enquanto o balanço entre a geração e a remoção é mantido. Existe a proposição de que as espécies reativas de oxigênio poderiam, inclusive, exercer funções de segundo mensageiro celular (Iuliano et al., 1992; Iuliano et al., 1994). Foi mostrado que a exposição de células de músculo esquelético a EROs afeta a velocidade do transporte iônico, incluindo a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Goldhaber, 1996) e potássio (Sen, 1995) pelo sarcolema e o de glicose (Balon e Nadler, 1994).

Por outro lado, há uma série de condições nas quais a velocidade de formação de espécies reativas está aumentada e/ou as defesas antioxidantes das células estão diminuídas. Neste caso, está estabelecido um **estresse oxidativo**, que pode resultar em dano ou mesmo morte celular. Há teorias que sugerem o envolvimento de radicais livres com processos de envelhecimento, câncer, lesões por radiação, danos celulares e tissulares pós-isquêmicos e também com o exercício físico

(Imlay e Linn, 1988; Halliwell e Gutteridge., 1990; Fridovich, 1986; Farber et al., 1990; Jenkins, 1988; Jenkins e Goldfarb, 1993; Alessio, 1993).

Acredita-se que o aumento na demanda de energia durante exercício físico, especialmente do tipo aeróbico, exige um aumento no fornecimento de oxigênio nos músculos ativos. A quantidade de oxigênio consumido durante exercício pode aumentar de 10 a 15 vezes. O fluxo de oxigênio em músculos periféricos aumenta 100 vezes, com um aumento de 30 vezes na circulação sanguínea. Isto ativa ainda mais o metabolismo oxidativo, maximizando a produção de energia por unidade de substrato e evitando acúmulo de lactato. Contudo, organismos aeróbicos têm que pagar um preço: uma maior produção de radicais livres (Sen, 1995).

Entretanto, trabalhos utilizando protocolos de treinamento do tipo contínuo (realizado a velocidades submáximas e crescentes) mostra um efeito adaptativo benéfico no organismo. Esta situação, aparentemente, promove aumentos da capacidade oxidativa e da defesa antioxidante dos músculos (Venditti e Meo, 1996). Deste modo, as adaptações não seriam acompanhadas por um aumento no nível de produção do ataque de EROs ao organismo.

Protocolos de treinamento do tipo intermitente, realizado por breves períodos, a alta intensidade (com predomínio do metabolismo anaeróbico) e intercalado por pausas curtas (com predomínio do metabolismo aeróbico), parecem simular um processo de “anoxia/reoxigenação”, conhecido gerador de EROs (Sjodin et al., 1990). Adaptações resultantes deste tipo de treinamento ainda não foram muito estudadas.

Sistema miofibrilar

As fibras musculares do músculo esquelético contêm miofibrilas, estruturas multinucleadas resultantes da fusão de vários mioblastos, que são formadas de filamentos protéicos arranjados em unidades chamadas sarcômeros. Os sarcômeros contêm principalmente miosina e actina, que são as principais proteínas contráteis (Figura 2).

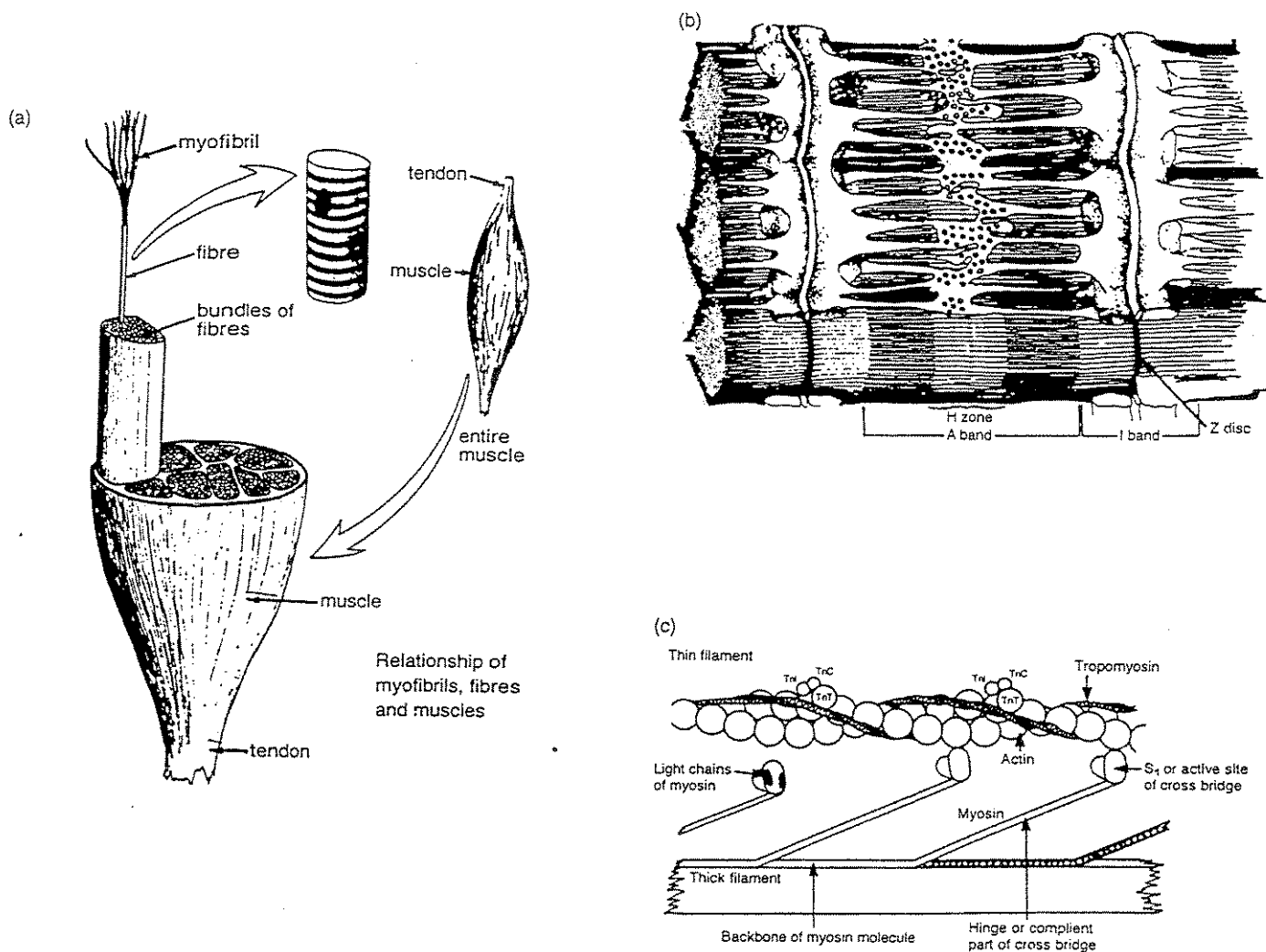


FIGURA 2: Diferentes níveis de organização do músculo esquelético. (a) Corte transversal de músculo esquelético mostrando as fibras. Dentro de cada fibra existem muitas miofibrilas que são os elementos contráteis. (b) Detalhe de miofibrilas (constituídas de sarcômeros: filamentos de miosina e actina) envolvidas por retículo sarcoplasmático e sistemas tubulares transversos. (c) Organização molecular dos filamentos delgado ("thin") e grosso ("thick"). Os filamentos delgados são rodeados de proteínas regulatórias, o complexo tropomiosina-troponina. Projeções de miosina interconectam o filamento grosso ao delgado, aonde apresentam a parte S1, dotada de atividade ATPásica e sítios de ligação á actina. (Retirado de Goldspink, 1996).

A molécula de miosina é composta de três tipos diferentes de cadeias peptídicas: um tipo de cadeia pesada (aproximadamente 200 kDa), e dois tipos diferentes de cadeias leves (aproximadamente 20 kDa). Uma molécula de miosina é um hexâmero que contém duas cadeias pesadas de miosina (CPM) idênticas e quatro cadeias leves, duas de cada tipo (Staron e Johnson, 1993).

As duas CPMs formam a maior parte da molécula de miosina e se encontram, na sua maioria, em conformação de dupla hélice (porção carboxi-terminal), de onde emerge um braço da ligação (porção amino-terminal) até os filamentos de actina. Próximo ao sítio de ligação à actina ocorre ainda um sítio para hidrólise de ATP. Cada “braço” deste corresponde a um sistema gerador de força independente, que puxa o filamento de actina para o centro do sarcômero às custas da hidrólise de ATP (Trybus, 1994).

A velocidade de contração de uma fibra muscular está relacionada à atividade específica de hidrólise de ATP exercida pela miosina (Barany, 1967). O ritmo em que os braços de miosina trabalham e consomem energia química varia consideravelmente com o tipo de fibra muscular e atividade para qual está adaptada (Alexander e Goldspink, 1977).

Fibras musculares de músculos posturais lentos, têm diferentes braços de miosina em relação às fibras de músculos fásicos rápidos, e esta diferença não explica apenas as diferenças na velocidade de contração como também na economia de desenvolvimento da força e na fadiga (Goldspink, 1985). Todas as cadeias pesadas e leves da miosina ocorrem como diferentes isoformas, e combinações diferentes de cadeias pesadas e leves podem aparecer na mesma fibra muscular e até no mesmo filamento de miosina. Porém, já foi demonstrado experimentalmente que o principal determinante da velocidade de contração é o tipo de CPM predominante no músculo (Reisner et al., 1985).

A princípio, as fibras musculares podem ser rápidas (tipo II) ou lentas (tipo I), cada tipo adaptado para diferentes funções motoras (Schiafino e Reggiani, 1994; Goldspink, 1996).

FIBRAS TIPO I: Esta fibra é composta de uma isoforma de CPM (CPM I) que hidrolisa ATP lentamente, logo, é mais eficiente e econômica para movimentos lentos e repetitivos ou para sustentação de força isométrica e não para geração rápida de força. Esta fibra é também chamada de oxidativa, pois realiza predominantemente a respiração aeróbica, contendo muitas mitocôndrias.

FIBRAS TIPO II: Há dois tipos de fibras rápidas, ambas adaptadas para gerar muita força, mas uma por um curto período de tempo (tipo IIb) e outra por períodos mais longos (tipo IIa). A tipo IIb é glicogenolítica e expressa CPM IIb, já a IIa tem relativamente mais mitocôndrias, um metabolismo mais oxidativo (por isso capaz de sustentar força por mais tempo) e expressa

CPMIIa. Em certos mamíferos como o rato e o coelho há ainda fibras tipo IIx, que expressam uma isoforma de CPM diferente, a CPMIIx, que têm características intermediárias entre as tipo IIa e IIb.

Existem fibras que coexpressam diferentes genes de CPMs. São fibras híbridas que contêm tanto CPMI e CPMIIa, CPMIIa e CPMIIX ou CPMIIx e CPMIIb (DeNardi et al., 1993).

Vários estímulos podem promover adaptações do sistema contrátil e, neste caso, ocorreria um processo de conversão de um tipo de fibra para outra. O processo de conversão de fibras não envolve só a síntese da nova isoforma como a degradação da antiga. A degradação protéica exerce uma importante função regulatória no remodelamento dos filamentos de miosina, pois as isoformas recém sintetizadas só podem ser inseridas no sarcômero depois que as isoformas não mais expressas sejam retiradas e degradadas (Termin e Pette, 1992). É possível que as isoformas recém sintetizadas sejam mais passíveis de degradação quando na forma livre do que quando já inseridas no filamento. Um maior "turnover" das novas isoformas seria o resultado desta condição. É plausível que isto funcionaria para prevenir a fibra muscular de mudar sua composição de isoformas de miosina prematuramente, logo, um estímulo teria que durar tempo suficiente para que houvesse o efeito tanto das rápidas mudanças transcricionais e traducionais como do demorado processo de proteólise (Termin e Pette, 1992).

Parece haver uma correlação inversa entre a habilidade de extrair e utilizar oxigênio e a porcentagem de fibras tipo IIb. Deste modo, um treinamento de resistência converteria as fibras glicolíticas em fibras mais oxidativas, fazendo com que a energia seja melhor aproveitada (o número de ATPs produzidos por molécula de oxigênio consumido (P/O) é maior nas fibras tipo I) (Kushmerick et al., 1992), possivelmente contribuindo com a melhora da performance física. Em ciclistas profissionais, músculos de indivíduos com maiores proporções de fibras tipo I no músculo vasto lateral geram maior carga energética para o mesmo volume de oxigênio utilizado (Coyle et al., 1992; Horowitz et al., 1994).

Contrariamente ao treinamento à resistência, atletas que necessitam grande força (velocistas e levantadores de peso) têm predomínio de fibras rápidas (Prince et al., 1976). O sedentarismo também está associado à conversão de fibras no sentido I→II (Jakobsson et al., 1991).

Para que uma fibra muscular possa realizar as adaptações necessárias é preciso que ela, primeiramente, possa suportar o estímulo. Dependendo da intensidade e natureza do estímulo, este pode configurar-se num impacto demasiadamente danoso à célula, e para neutralizá-lo, a célula deve possuir mecanismos de defesa rápidos e eficientes. A **resposta ao estresse** é um termo utilizado para nomear o mecanismo caracterizado por um rápido aumento da expressão de um determinado grupo de proteínas, denominadas proteínas de estresse, que têm a função de rapidamente proteger a célula contra os efeitos danosos dos estímulos, garantindo a sobrevivência da célula e, assim, possibilitando posteriores reprogramações adaptativas no metabolismo geral (Welch, 1993).

Deste modo, a resposta adaptativa inicia-se com a resposta ao estresse e, se o estímulo persistir, uma série de outras adaptações ocorrem. A função das proteínas de estresse em preservar as células do estresse e prepará-las para sobreviver a vários tipos de desafios sugere que estas proteínas possam ter função relevante em mediar a resposta adaptativa do músculo esquelético ao exercício físico (Hernando e Manso, 1997).

A resposta ao estresse foi primeiramente descrita em *Drosophila* após choque térmico (Ritossa, 1962) e a partir daí tem sido observado em células eucarióticas e procariontes mediante aplicação de uma grande variedade de condições estressantes. O mecanismo da resposta ao estresse se baseia na expressão de proteínas de estresse (PEs), que podem ser definidas como qualquer proteína que seja rapidamente expressa (horas) após aplicação de um determinado estresse e que participe do mecanismo de proteção contra os efeitos danosos do estresse. As HSPs ("Heat Shock Proteins", nome dado devido à relevância histórica do estudo com choque térmico), representam um dos grupos de proteínas que melhor se encaixa nesta definição, participando da resposta a muitos tipos diferentes de estresses como hipertermia, falta de glicose, aumento da concentração de cálcio intracelular, estresse oxidativo, análogos de amino ácidos, puromicina, etanol, infecção por certos vírus, hipóxia e presença de metais pesados (Hightower, 1991; Welch, 1992). O termo proteína de estresse foi introduzido devido à esta natureza mais ampla desta resposta. Embora os termos proteína de estresse e resposta ao estresse têm sido bastante úteis, é importante evitar de chamar HSPs de proteínas de estresse e resposta ao choque térmico de resposta ao estresse, existem muitas respostas celulares ao estresse e vários grupos de proteínas de estresse (Hightower, 1991)

Através de rápida transcrição e subsequente tradução preferencial das PEs, ocorre a proteção contra condições que poderiam ser letais. Por exemplo, fibroblastos microinjetados com anticorpos contra HSPs (inativando a HSPs) e submetidos a um choque térmico não letal, são incapazes de sobreviver a um segundo choque térmico mais forte, enquanto células controle, não

injetadas com os anticorpos conseguem sobreviver aos dois tratamentos. Porém, se células normais forem submetidas diretamente ao choque térmico mais forte, elas não sobrevivem, ficando claro a relevância de uma primeira hipertermia mais amena para criar a tolerância (Riabowol et al., 1988). O mecanismo da tolerância adquirida graças à presença das PEs ainda permanece incompletamente entendido.

O aumento da expressão dos genes hsp é geralmente proporcional à severidade do estresse. Porém, a indução das diferentes HSPs pode ser bastante diferente no que se refere à ordem de magnitude (DiDomenico et al., 1982).

Função das HSPs

As condições de estresse até agora citadas têm o marcante efeito de causar desestabilização estrutural de proteínas, isto é, alteram a conformação de proteínas, resultando na perda da função. Por analogia com o termo genotoxicidade (dano ao DNA por agentes químicos ou físicos), o termo proteotoxicidade parece ser útil para descrever danos às proteínas causados por agentes químicos ou físicos. Estes últimos poderiam ser, então, denominados de agentes proteotóxicos (Hightower, 1991).

As proteínas de estresse foram bastante conservadas durante a evolução, provavelmente desempenhando função importante e parecida em todos organismos. Nos últimos anos, tem ficado claro que HSPs estão diretamente envolvidas em processos vitais de biogênese e manutenção de proteínas, sendo denominadas de “chaperonas moleculares” (Ellis et al., 1989; Ellis e Van der Vliet, 1991). O termo chaperonas moleculares engloba um grande e variado grupo de proteínas cuja função parece ter surgido para resolver os problemas da alta concentração intracelular de proteínas, garantir o “folding”, oligomerização e transporte de proteínas, minimizar danos às proteínas durante estresse e restaurar a função de proteínas desnaturadas. Ainda, pelo fato de que a estrutura do polipeptídeo sendo transportado para organelas (assim que atravessa a membrana do retículo endoplasmático, mitocôndria ou cloroplasto) torna-se parecida com sua forma nascente ou desnaturada, a ação das chaperonas torna-se necessária nesta situação. As chaperonas atuam sem modificar covalentemente o seu substrato e sem fazer parte do produto (Hartman e Gething, 1996).

Utilizando RNA polimerase como modelo experimental, foi demonstrado que HSP72 desagrega e reativa proteínas danificadas pelo calor (Skowyrza et al., 1990). Ainda, algumas HSPs parecem influenciar a atividade de moléculas que regulam crescimento, diferenciação e adaptação celular (Welch, 1993).

As famílias de HSPs

Inúmeros grupos de HSPs coexistem e coatuam numa resposta ao estresse. Em células de mamíferos, elas possuem variados pesos moleculares (18 a 174 kDa), sendo que as famílias mais bem estudadas apresentam peso molecular aproximado de 70 e 60 kDa, correspondendo respectivamente às famílias HSP70 e HSP60. Elas apresentam a característica comum de serem chaperonas, mas cada família possui mecanismos funcionais e atividades adicionais específicas. Apesar de funcionalmente relacionadas, as famílias de HSPs são estruturalmente diferentes.

Família HSP70

Em células de mamíferos, as proteínas mais fortemente induzidas na resposta de estresse pertencem à família HSP70, um grupo de proteínas (de aproximadamente 70 kDa) intimamente relacionadas que inclui HSP72, HSP73, GRP78 e GRP75. Todas têm a propriedade de ligar ATP, mas têm distribuição subcelular diferenciada na célula.

A GRP78 (a denominação vem do fato de ser regulada por glicose, “glucose regulated protein”) é localizada no retículo endoplasmático rugoso e a GRP75 na mitocôndria (Becker e Craig, 1994). HSP72 e HSP73 localizam-se no citoplasma e no núcleo, sendo que aparentemente a HSP73 é constitutivamente expressa em altos níveis na maioria das células. Com estresse e produção de proteínas desnaturadas, ela migra para o núcleo e nucléolo onde se liga com préribossomos desnaturados ou em estado de “unfold”. A HSP72, por outro lado, é encontrada em pequenas quantidades em células não estressadas, sendo rapidamente sintetizada em resposta ao estresse. Black e Subject (1991) sugeriram que, de forma geral, a HSP73 atua em condições não estressantes (constitutivamente) e a HSP72 em situações de estresse (indutivelmente).

O mecanismo geral de ação parece ser a ligação com regiões hidrofóbicas expostas de proteínas parcialmente desnaturadas, solubilizando-as e protegendo-as. Regiões hidrofóbicas podem estar presentes em proteínas danificadas por agentes químicos ou físicos, em polipeptídeos recém sintetizados e em proteínas sendo translocadas à organelas, no momento de atravessar as membranas (Becker e Craig, 1994). O desligamento (dependente de ATP) da chaperona possibilitaria à proteína estabilizar-se na conformação correta. Este mecanismo apresenta muitas utilidades na célula e funções para diferentes HSPs têm sido descritas no metabolismo proteico, da síntese à degradação (Hendrick e Hartl, 1993).

Família HSP60

HSP60 é localizada na mitocôndria e, em menor quantidade, no citoplasma de células de mamíferos, estando em forma de grandes complexos de 14 subunidades. São denominadas de chaperoninas (como uma subclasse das chaperonas) e controlam o “folding” de várias diferentes proteínas.

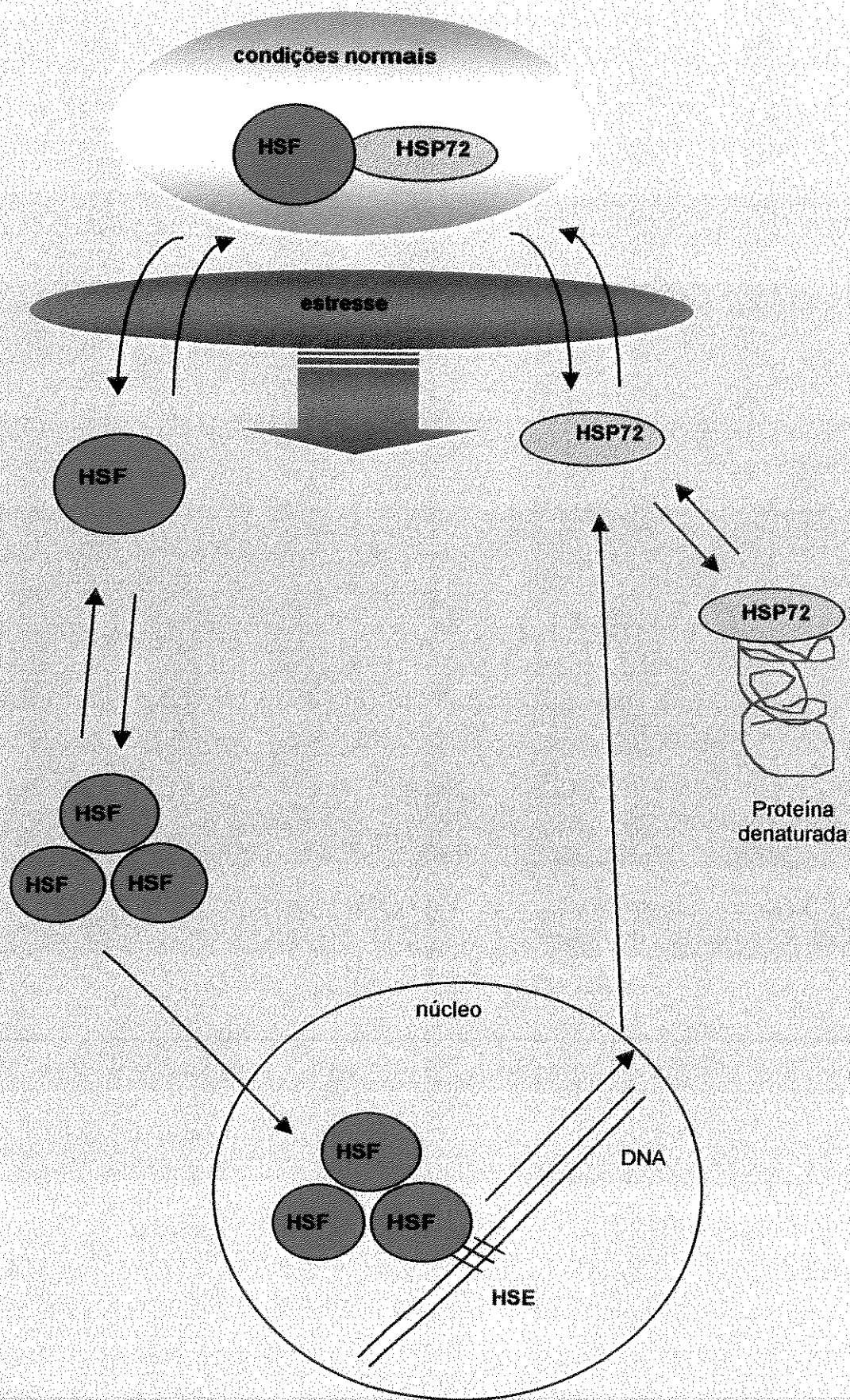


FIGURA 3: Mecanismo de ativação transcricional das HSPs sugerido por Morimoto, 1993 e Voellmy, 1996. Explicação detalhada pode ser encontrada no item ativação transcricional (página 17). HSF: Fator "Heat Shock"; HSE: Elemento "Heat Shock".

Diferentemente da HSP70, a HSP60 facilita o “folding” correto enquanto ainda associada com a proteína, graças ao fato de se ligar em vários sítios. Como a HSP70 contém um único sítio de ligação, o “folding” só pode ocorrer quando HSP70 se dissociar da proteína. Outras famílias (HSP32, HSP90, HSP25, HSP110)

Existem outras famílias de HSP que podem ou não possuir a função geral de chaperona. A família HSP90 está envolvida em transdução de sinais, apresentando grande especificidade de ligação à receptores esteróides e quinases. A família HSP25 parece ser especializada na montagem de grandes complexos protéicos (Welch, 1992). A HSP32 é uma enzima antioxidante que catalisa a conversão de grupos hemes à biliverdina (Essig e Nosek, 1997)

Ativação transcricional

A regulação transcricional das HSPs pode ser mediada pela ativação e ligação de fatores de transcrição “heat-shock factor” (HSF) aos “heat-shock elements” (HSE) no DNA. A capacidade de ligação aos HSE é estimulada indiretamente por oxidantes e outros agentes proteotóxicos, por uma via de sinalização sensível à presença de proteínas danificadas (Morimoto, 1993).

Embora muitos aspectos não estejam ainda elucidados, em eucariotos superiores, a regulação do HSF parece se processar por retenção citoplasmática. Isto é, em extratos de células não estressadas, HSF está geralmente presente no citoplasma como heterodímero, ligando-se com a HSP72. Quando um estresse é aplicado, aumentando assim a quantidade de proteínas desnaturadas, a HSP72 liga-se preferencialmente às proteínas desnaturadas, deixando HSF livre. Uma vez não ligado à HSP72, HSF tende a oligomerizar em homotrímeros e assim adquirir capacidade de entrar no núcleo e ativar a transcrição de várias HSPs (Voellmy, 1996). A Figura 3 mostra um esquema simplificado deste mecanismo.

Várias evidências indicam que as células podem distinguir entre formas nativas e desnaturadas da mesma proteína (Hightower, 1991). A HSP72 é referida por uns como sensor proteotóxico, sendo proteína com papel central no mecanismo de transdução do sinal proteotóxico e regulação transcricional das HSPs (Voellmy, 1996).

Atenuação e adaptação

Particularmente interessante é o fenômeno referido como **atenuação**. Células expostas a choque térmico extremo rapidamente iniciam alta síntese de proteínas de estresse, mantida pela duração do estresse. Quando células são sujeitas a um choque térmico moderado e prolongado, elas respondem inicialmente por um grande aumento na síntese, que é logo diminuído para níveis normais (a resposta parece ser atenuada). Esta atenuação é acompanhada por conversão da forma trimérica ativa do HSF para a monomérica, sem capacidade de ligar DNA.

Em contrapartida, exposição prolongada à temperatura extrema resulta na manutenção da transcrição do gene hsp e atividade do HSF de ligar DNA (Morimoto, 1993).

Deste modo, a síntese aumentada das PEs é um dos primeiros eventos adaptativos e está envolvida no combate imediato ao impacto, que tende a ser mais nocivo nos primeiros momentos, quando a célula ainda não teve tempo para realizar outros reajustes metabólicos importantes. A medida que a célula vai realizando os reajustes necessários e melhor se adaptando à nova condição, a síntese das PEs parece reduzir (atenuação). Se o estímulo for muito danoso, a célula continuará produzindo-as pois o seu metabolismo geral parece não conseguir adaptar-se.

A adaptação celular é um processo resultante de um estímulo exterior à célula e caracteriza-se, dentre outros, por alterações na transcrição gênica e na tradução. O processo de adaptação ocorre apenas se a célula sobreviver ao impacto danoso que geralmente resulta dos estímulos. A proteção de células contra os efeitos danosos de vários estresses é uma função atribuída às HSPs 70 (Welch e Feramisco, 1984; Sanchez et al., 1993) assim como à outras HSPs (Landry et al., 1989; Sanchez e Lindquist, 1990; Sanchez et al., 1993).

Quando problemas ocorrem no processo de “folding” de proteínas, o que acontece em células submetidas ao estresse por exposição a muitos agentes físicos e químicos, a célula responde aumentando a expressão das HSPs. Esta resposta celular induzida por estresse é essencial para a sobrevivência celular em condições adversas e para a viabilidade do processo do reajuste adaptativo do metabolismo celular (Bensande et al., 1996).

Estresses do exercício

O exercício produz uma série de condições adversas às fibras musculares ao mesmo tempo que induz à adaptação. Dentre os conhecidos estresses gerados no músculo pelo exercício estão: hipertermia (Brooks et al., 1971), estresse oxidativo (Davies et al., 1982), depleção de glicose e reservas de glicogênio (Ahlborg et al., 1967) e acúmulo de ácido láctico (Stainsby e Brooks, 1990).

O estresse gerado resulta, molecularmente, na rápida indução de HSPs. Esta resposta celular ao estresse foi observada, após exercício físico, no fígado, coração, músculo esquelético (Salo et al., 1991; Hemando e Manso, 1997), linfócitos (Locke et al., 1990) e em alguns outros tecidos.

HSPs e estresse oxidativo

Dado o potencial das EROs de danificar proteínas intracelulares durante contrações musculares, a capacidade do sistema de defesa antioxidante pré-existente poderia ser complementado pela síntese de HSPs (Essig e Nosek, 1997). Recentes pesquisas feitas por Brotto

e Nosek (1996) indicam que níveis elevados de EROs são capazes de danificar oxidativamente proteínas presentes no tecido muscular.

Evidências experimentais indicam que durante um estresse oxidativo, excessos de EROs participam direta ou indiretamente (possivelmente por proteínas desnaturadas) em uma ou mais vias sinalizadoras que levam a rápido aumento na síntese de HSPs (Applegate et al., 1991; Welch, 1992; Burdon, 1993; Vile et al., 1994; Borger et al., 1995). EROs promoveriam a exposição de aminoácidos hidrofóbicos do interior de proteínas que são alvos de ligação da HSP72, ativando assim a transcrição de várias HSPs.

Em músculos, a quantidade de HSP72 é proporcional à porcentagem de fibras tipo I (Locke et al., 1994). Foi sugerido que isto seria relacionado ao fato de fibras tipo I estarem continuamente sendo submetidas a um ambiente mais estressante, requerendo assim as funções da HSP72. Ainda não foi investigado se isto está relacionado a concentrações basais maiores de EROs em fibras tipo I.

O impacto da expressão de HSP72 no combate ao estresse oxidativo após exercício não foi totalmente elucidado. A hipótese atual é que a síntese aumentada de HSPs poderia prevenir danos oxidativos em proteínas ou auxiliar no reparo de proteínas danificadas durante contrações musculares repetitivas (Salo et al., 1991; Locke et al., 1994; Essig e Nosek, 1997).

O exercício pode aumentar a temperatura muscular para 45°C e a temperatura corporal para 44°C (Brooks et al., 1971). Há a proposta que as mitocôndrias musculares sofrem desacoplamento a temperaturas fisiológicas observadas com exercício, produzindo grandes quantidades de $O_2^{\cdot -}$ (Salo et al., 1991), que poderia levar à indução de HSP72. Por outro lado, Skidmore et al. (1995) mostraram que quando a temperatura corporal era mantida no nível normal, a proteína HSP72 ainda estava aumentada após exercício e Neuffer et al. (1996) detectaram indução de HSP72 na ausência de qualquer mudança na temperatura de músculos submetidos à estimulação elétrica de baixa frequência. Ainda, enquanto ainda não diretamente determinado no músculo esquelético, Kukreja et al. (1994) mostraram que no coração isolado de rato, uma variedade de espécies oxidantes podem rapidamente induzir mRNA de HSP72. Estes resultados sugerem que fatores diferentes de estresse térmico também contribuem para a indução de HSP72 durante exercício.

Altos níveis de EROs podem ser especialmente prejudiciais no músculo esquelético, pois este tecido apresenta níveis muito baixos de antioxidantes em relação ao fígado e rim. O músculo pode apresentar até 40 vezes menos catalase, 16 vezes menos SOD e 7 vezes menos glutatona total do que o fígado (Quiroga, 1992).

Além disto, o risco de estresse oxidativo deve ser maior em tecidos que apresentam grandes variações de consumo total de oxigênio entre condições normais e de máxima atividade. O músculo esquelético é um clássico exemplo disso.

OBJETIVOS

Não há informação sobre o efeito do treinamento nos níveis de expressão de HSP72, nem sobre a resposta ao estresse de um exercício intenso em indivíduos treinados. É preciso, também, esclarecer melhor como as várias adaptações metabólicas resultantes do treinamento físico influenciam o mecanismo da resposta ao estresse.

A hipótese de Essig e Nosek (1997) de que *“dado o potencial das EROs de danificar proteínas intracelulares durante contrações musculares, a capacidade do sistema de defesa antioxidante pré-existente poderia ser complementado pela síntese de HSPs”* seria uma proposta interessante para ser estudada por comparação entre variações da HSP72 e das enzimas do sistema antioxidante após o estresse do exercício.

Os objetivos da presente tese são:

- (1) Analisar o efeito do treinamento nos níveis de HSP72: padronizar as técnicas de detecção e analisar o efeito de treinamentos dos tipos intermitente e contínuo na quantidade de HSP72 nos músculos sóleo (oxidativo) e semitendinoso (glicolítico);
- (2) Analisar o efeito do treinamento na resposta ao estresse: sabendo que um exercício intenso resulta num aumento significativo da HSP72 (resposta ao estresse) em ratos não treinados, analisar a resposta ao estresse pela análise da HSP72 nos ratos treinados após o mesmo exercício intenso à que os ratos sedentários foram submetidos;
- (3) Discutir os resultados das análises quantitativas da HSP72 com os resultados obtidos pelo grupo sobre os seguintes biomarcadores:
 - Citrato sintase (metabolismo oxidativo);
 - Catalase e glutathione redutase (defesa antioxidante);
 - Isoformas da cadeia pesada de miosina (tipo de sistema miofibrilar).
- (4) Analisar a presença da enzima antioxidante tioredoxina redutase em músculos esqueléticos de rato. Muito pouco se sabe sobre esta enzima em músculos esqueléticos de mamíferos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar com 2 meses de idade no início dos treinamentos (4 meses quando sacrificados). Durante todo o experimento, os ratos foram mantidos em ambiente controlado (18-22°C e fotoperíodo invertido de 12 horas), estando providos de ração de laboratório e água *ad libitum*.

Protocolos de treinamento

Antes de iniciar os treinamentos, todos os ratos passaram por fase de adaptação à esteira, correndo a baixas velocidades (5-15 m/min). Os protocolos de treinamento (tabela 1) contínuo (realizado a velocidades submáximas e crescentes) e intermitente (realizado através de tiros rápidos, de alta intensidade, intercalado por pausas curtas) foram aplicados nos ratos (n=3) 5 vezes por semana, tiveram a duração total de 8 semanas e foram realizados em esteira rolante com inclinação de -3°. Ambos foram divididos em duas fases:

- a) Fase I (primeiras 4 semanas): aumento progressivo na intensidade e duração do esforço;
- b) Fase II (últimas 4 semanas): manutenção na intensidade e duração do esforço.

TABELA 1: Protocolos de treinamento contínuo e intermitente. Os protocolos foram aplicados 5 dias por semana (de Segunda a Sexta-feira).

Contínuo				Intermitente			
Semana	Velocidade (m/min)	Tempo (min)		Velocidade (m/min)	Tempo (min)	Pausa (min)	Número de Repetições
1 ^a	15	20		20	5	2	4
2 ^a	20	30		30	2,5	1	4
3 ^a	22,5	45		32,5	2,5	1	6
4 ^a	25	60		35	2,5	1	6
5 ^a a 8 ^a	25	60		35	2,5	1	6

Protocolo de exercício intenso

Após o término dos treinamentos, animais controle (sedentários) foram submetidos a corrida em esteira até o esgotamento físico, considerado o momento em que ratos sedentários desistem de continuar correndo.

O protocolo foi determinado de forma que animais sedentários conseguissem correr até o esgotamento físico mesmo sem estarem adaptados à corrida na esteira. Optou-se, então, por dois repetidos aumentos gradativos da velocidade, de forma que os animais pudessem se adaptar durante o próprio protocolo. Após a definição da velocidade e duração do exercício que se configurasse num esgotamento físico para animais sedentários, os animais de ambos os treinamentos, ao final dos mesmos, foram submetidos a este mesmo protocolo. O objetivo foi de comparar as respostas de ratos sedentários e treinados (contínuo e intermitente) submetidos ao mesmo exercício, possibilitando analisar o efeito do treinamento nas respostas.

TABELA 2: Protocolo de exercício intenso. O protocolo foi determinado de forma que animais sedentários conseguissem correr até o esgotamento físico mesmo sem estarem adaptados à corrida na esteira. Foi realizado por dois repetidos aumentos gradativos da velocidade, de forma que os animais pudessem se adaptar durante o próprio protocolo. Inclinação da esteira foi de -3°.

Tempo (minutos)	Velocidade (m/min)
0-5	10
6-10	15
11-25	20
26-27	0 (pausa)
28-32	10
33-37	15
38-52	20
53-62	25
63-82	30
DURAÇÃO TOTAL 82 minutos	

Retirada dos músculos

Os ratos foram previamente anestesiados com hidrato de cloral 10% (m/v), na proporção de 0,3 mL para cada 100g de peso corporal. No mínimo de 48 horas após o final dos treinamentos ou exatamente 2 horas após aplicação do protocolo de exercício intenso, os músculos sóleo, diafragma, semitendinoso e extensor digital longo da perna direita foram retirados, sendo imediatamente pulverizados com nitrogênio líquido e armazenados a -70°C.

Preparação das amostras

Para as análises, os músculos foram minuciosamente fatiados e homogenizados, utilizando homogenizador do tipo Potter-Elvehjem, em três volumes (peso/volume) de tampão (pH 7,2) KH_2PO_4 0,1M, K_2HPO_4 0,05M contendo inibidores de proteases (EDTA 0,01M e PMSF 0,002M) e KCl 0,3M. Em seguida, o homogenato foi submetido a agitação em “vortex” por 3 minutos, sonicação em gelo por 5 minutos e, novamente, agitação em “vortex” por mais 5 minutos para promover maior solubilização de proteínas. O homogenato foi então centrifugado em minicentrífuga por 5 minutos a 6000rpm para precipitar restos de tecido não solubilizados. O sobrenadante foi então diluído 1:1 em tampão de amostra (Tris-HCl 0,18M, Glicerol 30%, SDS 6,9%, 0,001% Bromofenol blue, pH 6,8) com dithiothreitol (DTT) 0,2M e armazenados a -20°C em alíquotas. As amostras eram então incubadas a 60°C por 5 minutos e submetidas às análises eletroforéticas. Na Figura 4 é mostrado um esquema do procedimento de preparação de amostra.

O procedimento foi padronizado de modo a se obter amostras com concentrações protéicas compatíveis tanto com as análises de detecção da HSP72 quanto com a tipagem de isoformas de cadeia pesada de miosina, uma vez que isto asseguraria uma economia de amostra e trabalho e também uma maior fidelidade nas análises de relação entre os resultados de ambas as técnicas.

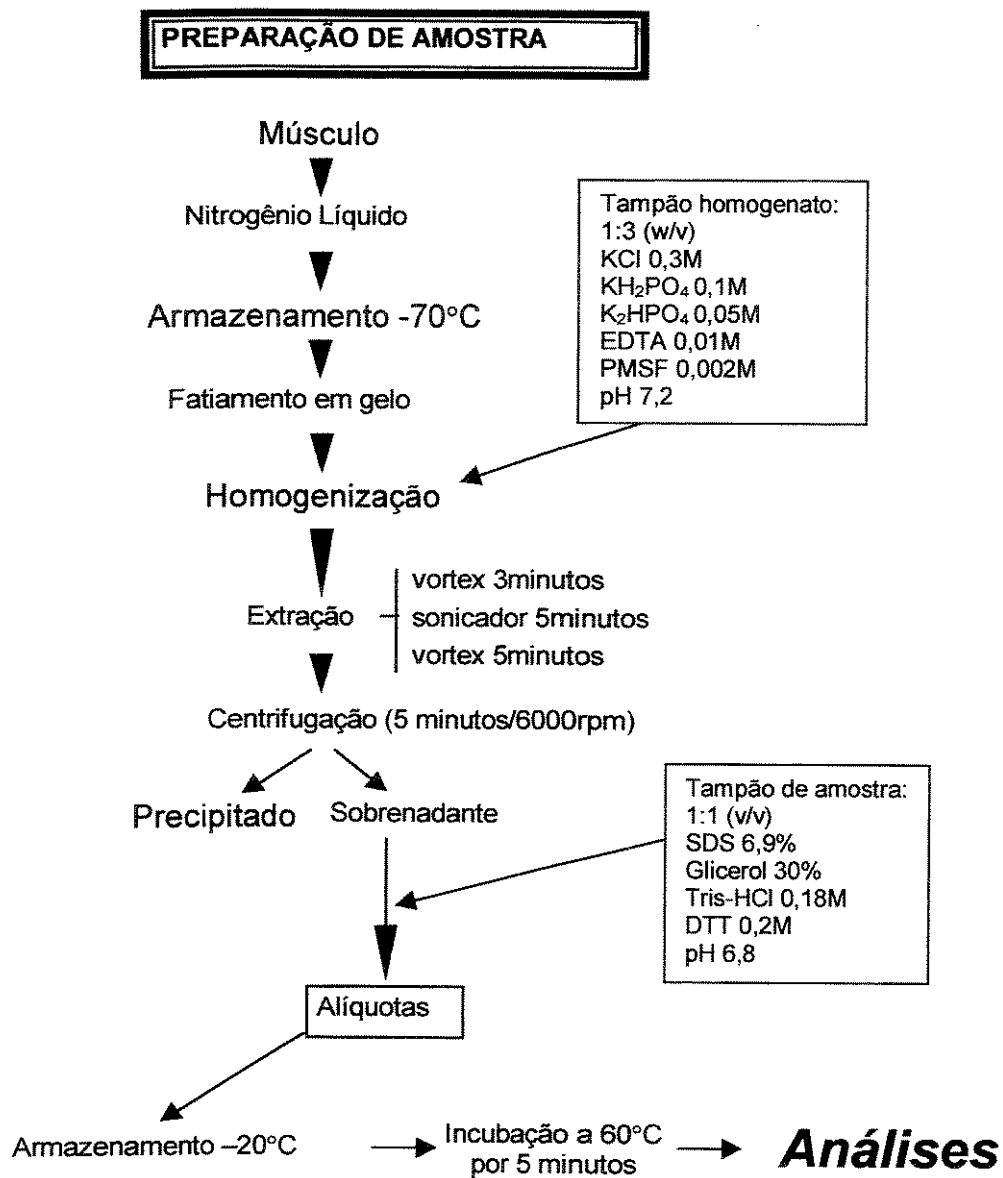


FIGURA 4: Procedimento de preparação de amostra. Explicação detalhada contida em texto da página 25.

Dosagem de proteínas

As dosagens protéicas foram realizadas pelos métodos de Lowry (1951) ou do ácido bicinonínico (Smith et al., 1985), BCA, utilizando “Micro BCA Protein Assay Reagent Kit” da Pierce, Rockford, IL, USA.

Porém, observou-se que quando se trabalha com uma quantidade muito grande de amostras, as dosagens de proteínas comumente realizadas não são muito precisas. Isto ocorre pois são frequentes os problemas de erros de pipetagem, erros de diluição, vidraria mal lavada, erros na leitura das amostras.

No sentido de garantir um maior controle da quantidade de proteína das amostras, optou-se por fazer, além das dosagens descritas, um controle densitométrico das eletroforeses do perfil total (como mostrado no ítem controle eletroforético da quantidade de proteínas).

SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo-se o descrito por Laemmli (1970). O gel de empacotamento teve a concentração de 5% de acrilamida, já a concentração do gel de separação (“running gel”) foi de 12,5%. As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque (Bio Rad, CA, EUA) a 30% e N-N-metileno-bisacrilamida estoque (Bio Rad, CA, EUA) a 0,8%, ambas dissolvidas em água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore - Water Corporation, MA, EUA) filtradas em papel de filtro (Whatman número 1) e mantidas a 4°C em frasco âmbar.

As eletroforeses SDS-PAGE foram realizadas em sistema SE 400 (16 X 14 cm) da Hoefer (CA, EUA).

A quantidade de proteína aplicada foi de 80µg para as análises do perfil total e das isoformas da cadeia pesada de miosina e 160µg para análise da HSP72. As amostras foram incubadas por 5 min a 60°C antes de serem aplicadas.

A eletroforese foi realizada no tampão de corrida (Tris-HCl 0,025M, glicina 0,192M, SDS 0,1%, sendo que o pH desta solução não é acertado). A voltagem utilizada foi de 90V e 200V (SE-400), para gel de empacotamento e gel de corrida, respectivamente.

O gel retirado do sistema de placas foi corado com solução de Coomassie Blue R-250 0,1% em ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v) durante três horas. Em seguida, foi descorado em solução de ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v/v).

Para a realização do “Western blot”, o gel não foi corado, passando diretamente para o procedimento de transferência para membrana de PVDF.

Controle eletroforético da quantidade de proteínas

Para que houvesse um maior controle da quantidade de proteínas totais, foram realizadas eletroforeses do perfil total de proteínas nas amostras, que foram coradas com Coomassie Blue para monitoramento densitométrico. Os valores provindos da densitometria do perfil eletroforético total de cada amostra foram utilizados para realizar um “ajuste fino” (por normalização) da quantidade de amostra a ser aplicada nas subseqüentes análises, de modo a garantir a aplicação de quantidades iguais de proteínas de diferentes amostras.

A normalização foi feita dividindo-se o valor densitométrico total pelo volume (em microlitros) de amostra aplicada. Adicionalmente, foram realizadas novas eletroforeses do perfil total, aplicando-se quantidade de proteína normalizada. O controle densitométrico destas eletroforeses demonstraram que o procedimento alcançou o objetivo.

Teste de estabilidade de proteínas

Para garantir que as proteínas das amostras (submetidas ao procedimento de preparação de amostra descrito) não estavam sofrendo proteólise, oxidação, agregação ou outros processos que pudessem comprometer a integridade das mesmas, foram realizados testes de estabilidade de proteínas. Para tanto, amostras foram incubadas por 24 horas a 37°C, sendo posteriormente submetidas à análises eletroforéticas do perfil total e comparadas com amostras normais (não incubadas, mantidas a -20°C).

Ainda, foi realizado um ensaio para determinar o efeito de altas concentrações de DTT na estabilidade das proteínas. Foram preparadas amostras com DTT 0,1M (como no protocolo padrão) e com DTT 0,01M (concentrações finais), sendo ambas submetidas a incubação por 24 horas a 37°C e, posteriormente, à análises eletroforéticas do perfil total.

Teste de reprodutibilidade da preparação de amostra

No intuito de analisar a reprodutibilidade da preparação de amostra, o músculo diafragma de seis ratos diferentes foram preparados seguindo o procedimento padrão e, depois, submetidas à análise eletroforética do perfil total. O padrão de bandas formadas e a quantificação das mesmas servem como índices para análise da reprodutibilidade.

Determinação e quantificação de isoformas de cadeia pesada de miosina (CPM) por SDS-PAGE de longa duração

Este ensaio eletroforético foi feito seguindo protocolo similar ao descrito por Talmadge e Roy, 1993, com algumas modificações. A preparação de amostra foi feita como descrito nesta tese, sendo a eletroforese realizada em sistema SE-400 de Hoefer (CA, EUA) utilizando gel com 8% de acrilamida e 32,5% de glicerol, aplicando-se 80µg de proteína. A duração da corrida foi de

26 horas, ficando o sistema mantido em câmara fria (10-15°C). O gel foi corado utilizando o corante Comassie Blue 0,05% em solução de metanol 40% e ácido acético 10%.

Nestas condições, proteínas com menos de 100kDa são eluídas do gel e ocorre um efeito de ampliação da região referente às proteínas com 200kDa (CPM tem aproximadamente 200 kDa). Isto faz com que as isoformas da CPM sejam separadas em diferentes bandas e facilmente identificadas pois são as proteínas mais abundantes desta faixa da massa molecular.

Eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida (2D-PAGE)

Pré-tratamento das amostras envolve solubilização, desnaturação e redução para quebrar completamente as interações. O tampão de solubilização utilizado foi: Uréia 8M, 3-[3-cholamidopropyl]dimethylamonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 4%, ditioneitol (DTT) 0,05M e Tris-HCl 0,04M.

A 2D-PAGE envolve uma primeira separação baseada no pI das proteínas (focalização isoeletrica, IEF ou primeira dimensão) e uma segunda separação baseada na mobilidade relativa das proteínas (SDS-PAGE ou segunda dimensão). Foi seguido protocolo idêntico ao do SWISS-2D-PAGE estando todas as condições detalhadamente explicadas no endereço eletrônico <http://www.expasy.ch/ch2d/>. No final, as proteínas foram reveladas por coloração usando prata amoniacal (protocolo também disponível no endereço citado).

Western blot

A técnica de "Blotting" permite que proteínas, separadas em gel de poliacrilamida, possam ser transferidas e imobilizadas em membranas de PVDF (polivinildileno difluoreto). As bandas transferidas são passíveis de análise por autoradiografia, imunodeteção e eluídas para análise de aminoácidos ou sequência da cadeia polipeptídica (LeGendre e Matsudaira, 1988).

O tampão de transferência foi preparado com 2,2g de 3-ciclohexil- amino-1-ácido propanosulfônico (CAPS) em 900 mL de água, sendo titulado a pH 11 com NaOH 2N, e o volume final completado a 1 L com 100mL de metanol. A membrana de PVDF e o gel de poliacrilamida foram colocados para equilibrar com tampão CAPS por 5 minutos. O gel foi colocado sobre a membrana em suporte plástico e a transferência se fez a 400mA por 45 minutos a 15°C em sistema refrigerado da série TE (Hoefer, CA, EUA).

Para a imunodeteção, a membrana foi bloqueada com tampão (pH 7,6) Tris HCl 0,02M, NaCl 0,15M, Tween 0,05% (TBST), contendo 5% de leite em pó desnatado, por 1 hora em agitação suave e, em seguida, lavada por três vezes com TBST e incubada "overnight" com anticorpo policlonal, diluição 1:2000 em TBST, feito contra a proteína TrPx ("Thioredoxin peroxidase") de levedura ou com anticorpo monoclonal contra HSP72 (SPA-810, StressGen, Canadá), diluição 1:1000 em TBST. Como segundo anticorpo, foi utilizado um anticorpo "anti-

rabbit” (para anticorpo primário do tipo policlonal) ou “anti-mouse” (para anticorpo primário do tipo monoclonal) conjugado com fosfatase alcalina (BioRad, CA, EUA) diluído 1:2000 no tampão TBST, deixando-se incubar por 2h, seguido por 3 lavagens de 10 minutos com TBST.

Para a revelação, utilizou-se os substratos NBT, Nitroblue Tetrazolium e BCIP, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl fosfato (ambos da Promega, WI, EUA). Para preparação da solução de revelação, adicionou-se 33 μ L de solução de NBT (50mg dissolvido em 1mL de 70% Dimetil Formamida) e 16,5 μ L de solução de BCIP (50mg dissolvido em 1 mL de 100% Dimetil Formamida) em tampão Tris-HCl 0,1M pH 9,5 contendo NaCl 0,1M e MgCl 5mM.

Análises Densitométricas

Análises densitométricas foram feitas utilizando “Sharp-Scanner” para aquisição de imagem e programa ImageMaster 1D Elite (Amershan Pharmacia, Uppsala, Suécia) para análise e processamento de dados. As análises foram utilizadas para:

- Teste da reprodutibilidade da preparação da amostra;
- Normalização da quantidade de proteína;
- Quantificação dos “Western blots”.

Análises estatísticas

Todos os resultados estão expressos como média + desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa “Statistica for Windows”, versão 4.3 (Statsoft, Inc. 1993). Valores de probabilidade (P) < 0.05 foram considerados significantes.

RESULTADOS

Preparação das amostras

Como comprovado pelo monitoramento eletroforético do perfil total de proteínas (Figura 5), a preparação das amostras seguindo o protocolo descrito em Materiais e Métodos (amostras contendo DTT 0,1M) resultou em significativa estabilidade às proteínas. Mesmo após uma incubação de 24 horas a 37°C, o padrão de bandas do perfil total manteve-se inalterado. Porém, se a concentração de DTT final na amostra era reduzida para 0,01M, nota-se que o padrão de bandas do perfil total era alterado após a incubação por 24 horas a 37°C. Muitas bandas desapareciam ou diminuam de intensidade, mostrando que alteração de proteínas estava ocorrendo. Para este ensaio utilizou-se preparações do músculo sóleo.

Para análise da reprodutibilidade da preparação da amostra utilizou-se o músculo diafragma de seis ratos diferentes (Figura 6), separadamente preparados. Por análise visual, nota-se que o padrão de bandas do perfil eletroforético total dos seis músculos é bastante similar, indicando que a preparação de amostra foi reprodutível. A reprodutibilidade foi, ainda, confirmada por análises densitométricas (dado não mostrado).

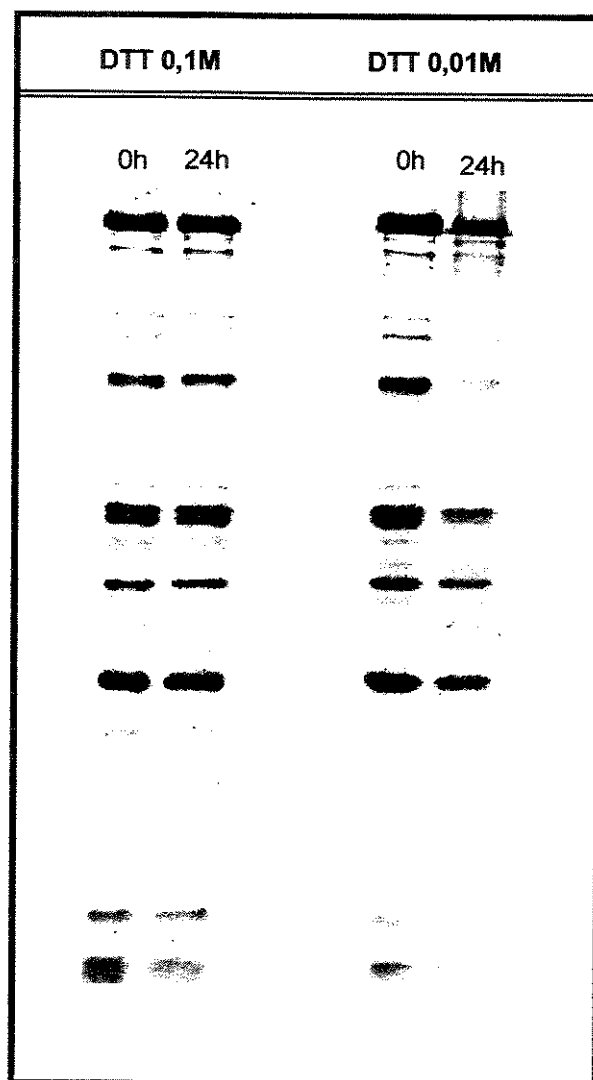


FIGURA 5: Análise da estabilidade de proteínas por monitoramento eletroforético (SDS-PAGE 12,5%) do perfil total de proteínas do músculo sóleo. A estabilidade das proteínas musculares utilizando-se o protocolo mostrado em Materiais e Métodos (amostras com DTT 0,1M) é mantida mesmo após incubação da amostra por 24 horas a 37°C, porém, é comprometida quando a concentração de DTT é reduzida para 0,01M, como pode ser observado pelo efeito de diminuição do tamanho e intensidade das bandas. 24h = amostras incubadas por 24 horas a 37°C após preparação; 0h = amostras congeladas após preparação.

PARTE II: Caracterização dos músculos

Determinação e quantificação de isoformas de cadeia pesada de miosina (CPM)

Os músculos em estudo foram classificados quanto ao tipo de fibra muscular. O músculo sóleo apresentou maior porcentagem de CPM I, seguido pelo diafragma, extensor digital longo e, por último, o semitendinoso. Este último contém apenas CPM IIb, sendo um músculo essencialmente glicolítico. Por outro lado, o músculo sóleo, por apresentar mais CPM I, pôde ser considerado o mais oxidativo dos músculos em questão. Os dados estão mostrados na Tabela II e Figura 7.

TABELA 3: Isoformas de CPM predominantes em cada músculo estudado e a respectiva capacidade oxidativa relativa. Os dados são baseados na figura 7.

MÚSCULO	CPM PREDOMINANTE	CAPACIDADE OXIDATIVA
SÓLEO	Tipo I	ALTA
DIAFRAGMA	Tipo IIa	MÉDIA/ALTA
EDL	Tipo IIa/IIx/IIb	MÉDIA/BAIXA
SEMITENDINOSO	Tipo IIb	BAIXA

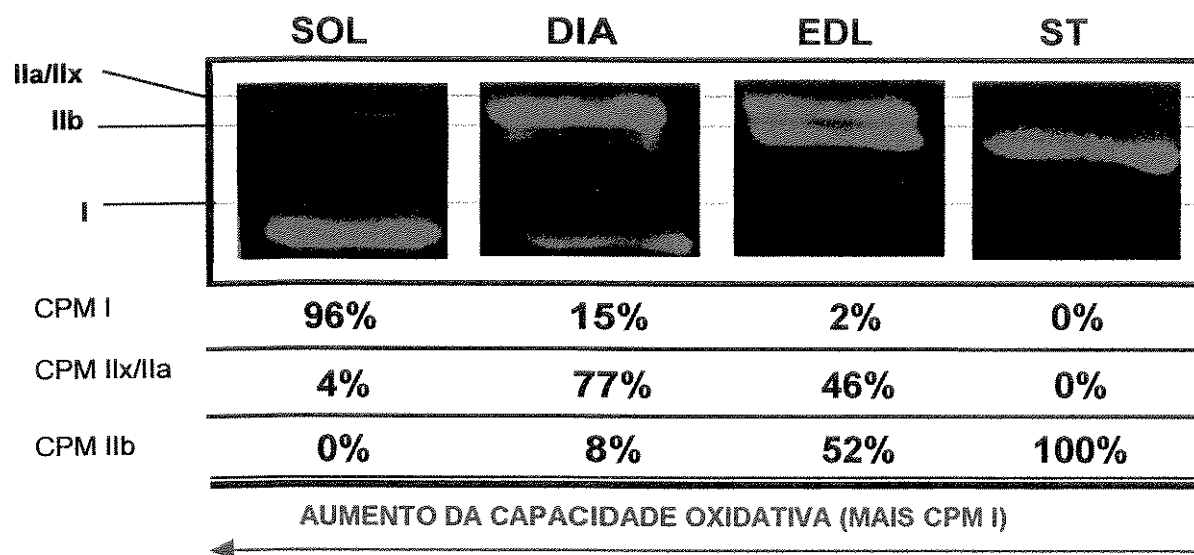


FIGURA 7: Separação e quantificação das isoformas de cadeia pesada de miosina (CPM) de músculos esqueléticos de rato controle por SDS-PAGE 8% com glicerol 37% (26 horas de corrida). São mostradas as bandas das isoformas de CPM presentes em cada músculo e as respectivas porcentagens de cada isoforma, determinadas por análises densitométricas. Quanto maior a porcentagem de CPM I, maior a capacidade oxidativa do músculo. SOL: sóleo, DIA: diafragma, EDL: extensor digital longo, ST: semitendinoso.

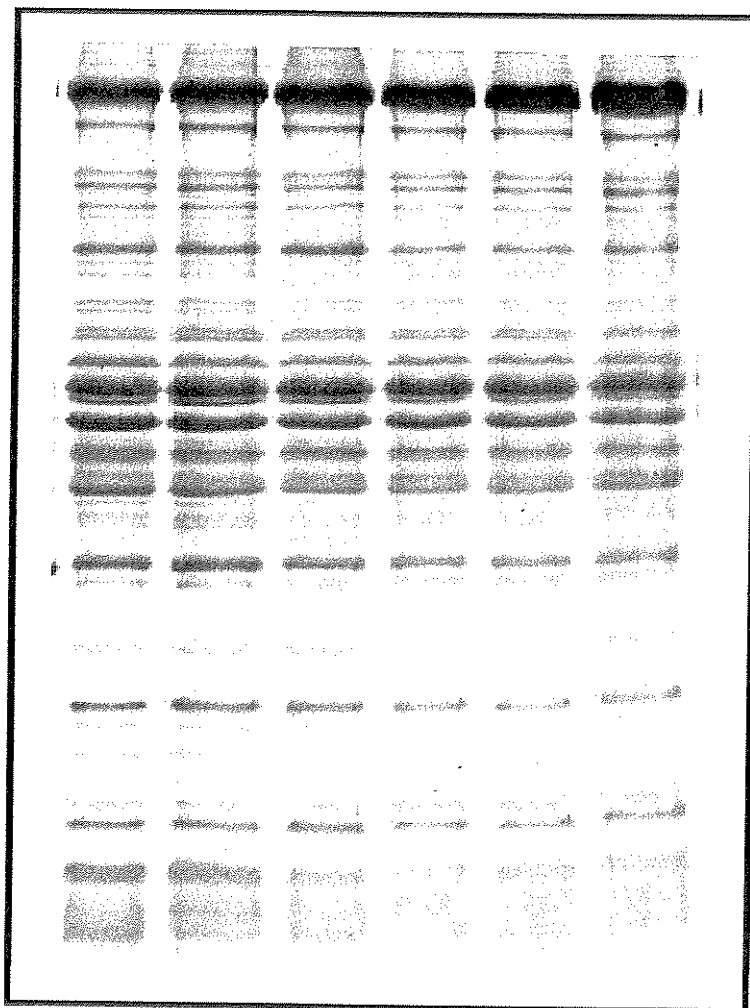


FIGURA 6: Teste de reprodutibilidade da preparação de amostra por monitoramento eletroforético (SDS-PAGE 12,5%) do perfil total de proteínas do músculo diafragma de seis ratos diferentes, separadamente preparados seguindo o protocolo descrito em Materiais e Métodos. O padrão de bandas do perfil eletroforético das proteínas totais das seis distintas amostras é bastante similar, o que comprova a reprodutibilidade da preparação da amostra.

Perfil Total

A Figura 8 mostra o perfil eletroforético total de proteínas dos músculos em questão. Os músculos estão na ordem de maior para menor capacidade oxidativa: sóleo, diafragma, extensor digital longo e semitendinoso; como determinada pelo método de determinação e quantificação de isoformas de CPM por eletroforese SDS-PAGE de longa duração (Figura 7). É possível observar que muitas bandas diminuem ou aumentam de tamanho nos diferentes músculos seguindo esta ordem. Por exemplo, uma proteína expressa em baixos níveis no músculo sóleo, passa a apresentar níveis de expressão cada vez maiores nos outros músculos a medida que a capacidade oxidativa muscular diminui, o contrário também ocorrendo. As isoformas de CPM não são separadas em diferentes bandas nestas condições eletroforéticas.

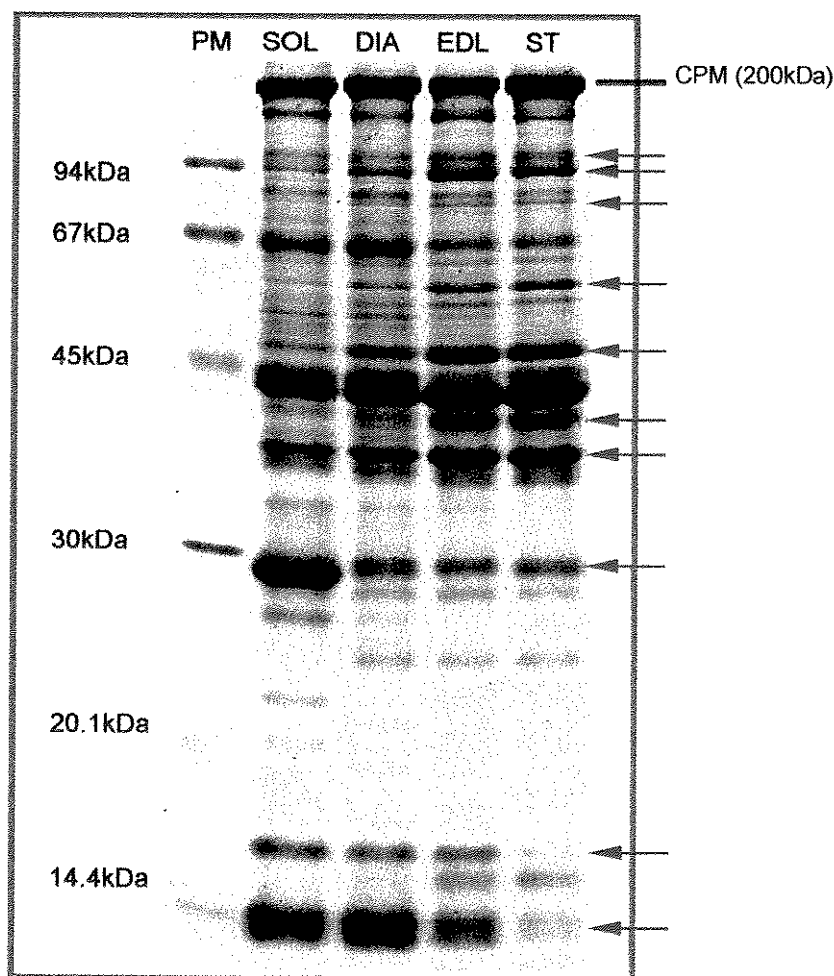


FIGURA 8: Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12,5%) total de proteínas de músculos esqueléticos de rato controle. Os músculos estão em ordem decrescente em relação à maior capacidade oxidativa e as setas vermelhas indicam as bandas que diminuem ou aumentam seguindo esta ordem. CPM indica a banda correspondente às isoformas de CPM, que, nestas condições eletroforéticas, não são separadas em diferentes bandas. PM: padrão de massa molecular; SOL: sóleo, DIA: diafragma, EDL: extensor digital longo, ST: semitendinoso.

Tioredoxina peroxidase

TrPx (tioredoxina peroxidase), uma enzima antioxidante com atividade peroxidásica dependente de tiol, foi detectada nos músculos em questão por Western blot utilizando anticorpo policlonal feito contra TrPx de levedura. A Figura 9 mostra que quanto maior a quantidade de CPM I no músculo (segundo dados da Figura 7), maior é a quantidade de TrPx presente.

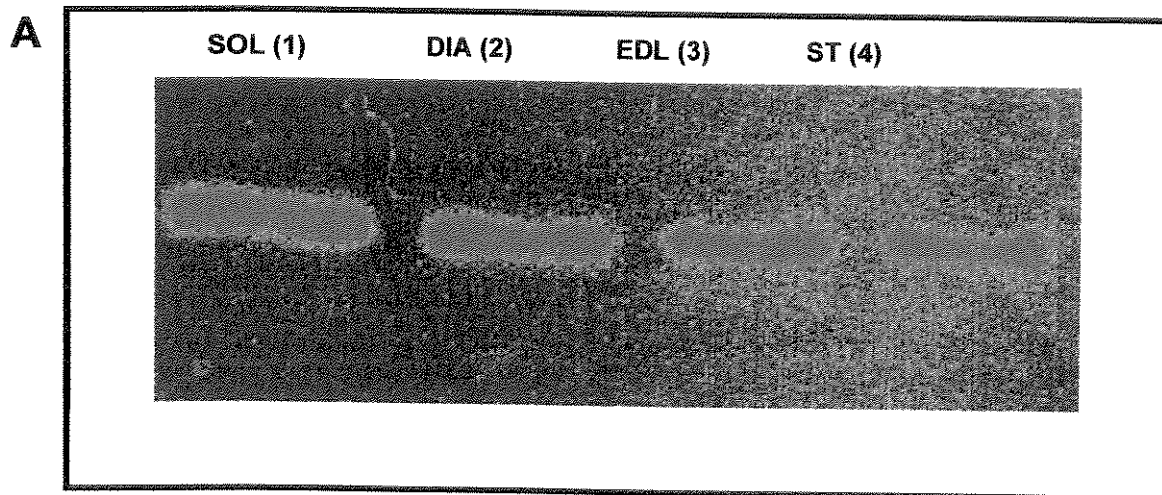
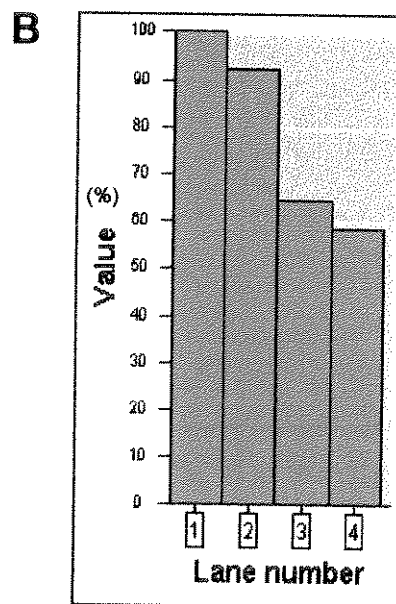


FIGURA 9: (A) Western blot para detecção de TrPx em músculos esqueléticos de rato controle. 160 μ g de proteína de cada músculo foi aplicado para a separação por SDS-PAGE 12,5%, transferência para membrana de PVDF e posterior detecção utilizando anticorpo policlonal feito contra TrPx de levedura. SOL: sóleo, DIA: diafragma, EDL: extensor digital longo, ST: semitendinoso. (B) Quantificação densitométrica. O valor encontrado para a quantidade de TrPx em sóleo foi considerado 100%. Os resultados são representativos de 3 experimentos.



Detecção de HSP72

A Figura 10 mostra detecção da HSP72 por Western blot e quantificação da mesma por densitometria. A HSP72 está mais presente em músculos com mais CPM I, com exceção ocorrendo no músculo diafragma, que apresentou níveis comparáveis aos encontrados no músculo semitendinoso, músculo com menor quantidade de CPM I dos músculos em questão.

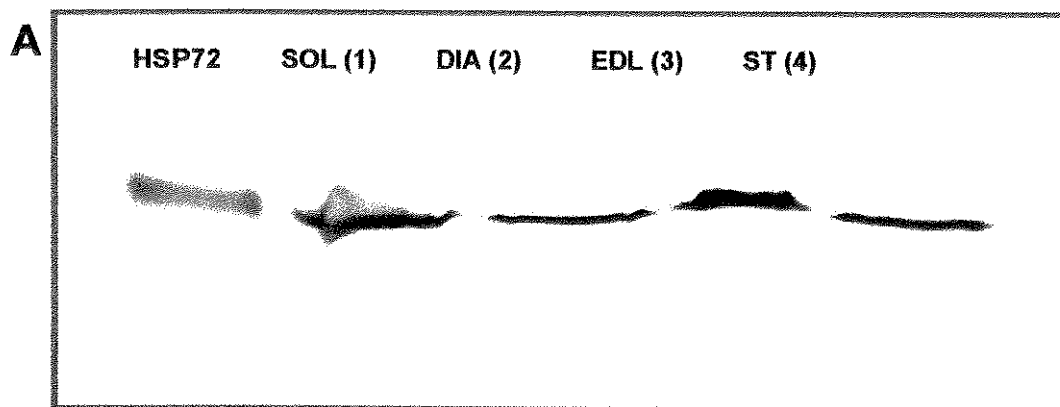
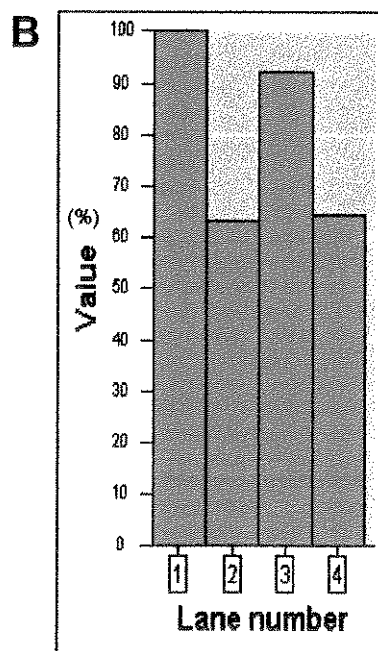


FIGURA 10: (A) Western blot para detecção de HSP72 em músculos esqueléticos de rato controle. 160 μ g de proteína de cada músculo foi aplicado para a separação por SDS-PAGE 12,5%, transferência para membrana de PVDF e posterior detecção utilizando anticorpo monoclonal específico para HSP72. SOL: sóleo, DIA: diafragma, EDL: extensor digital longo, ST: semitendinoso. (B) Quantificação densitométrica. O valor encontrado para a quantidade de HSP72 em sóleo foi considerado 100%. Os resultados são representativos de 3 experimentos.



Identificação da HSP73, HSP72 e HSP60 em eletroforese 2D-PAGE do músculo sóleo

A Figura 11 mostra eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida de proteínas totais do músculo sóleo de rato controle corado pela coloração de prata. Da esquerda para a direita há um aumento do *pI*, já de baixo para cima a massa molecular aumenta. Os pontos referentes às HSPs 73, 72 e 60 estão mostrados na Figura 12 (ampliação de parte da Figura 11).

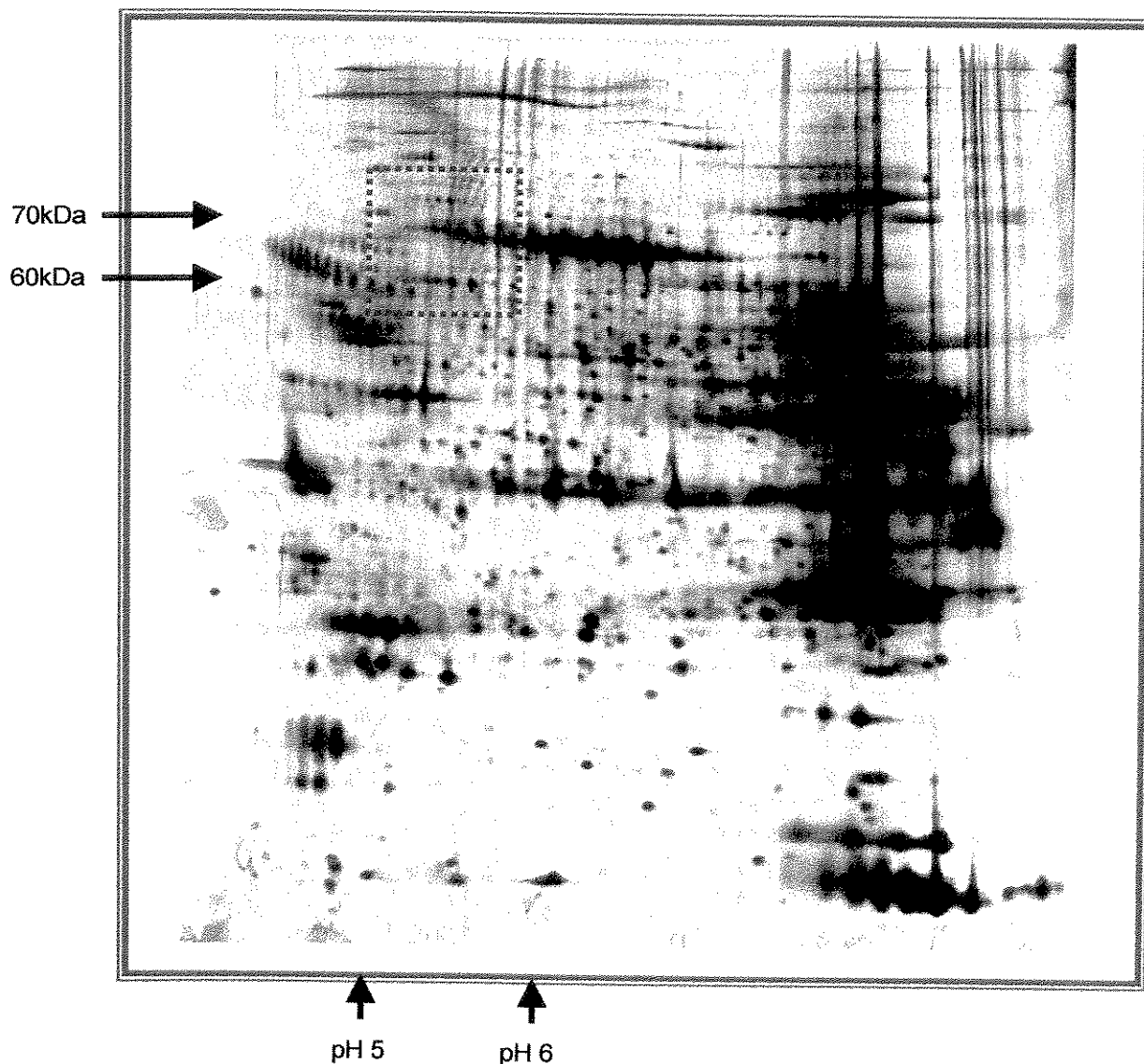


FIGURA 11: Eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida de proteínas totais do músculo sóleo de rato controle. A primeira dimensão foi feita em gradiente não linear de pH 3 à pH 10, já a segunda dimensão foi feita em SDS-PAGE com gradiente de concentração de acrilamida de 8 à 18%. O gel foi corado pela coloração de prata. Da esquerda para a direita há um aumento do *pI* e de baixo para cima a massa molecular aumenta. O quadrado pontilhado indica a localização do gel que foi ampliado na figura 13 e que contém os pontos referentes às HSPs 72, 73 e 60.

Os pontos correspondentes à HSP72, HSP73 e HSP60 puderam ser identificados (Figura 12) por comparação com os pontos destas HSPs presentes e já identificadas nas 2D-PAGEs de fígado e rim (Witzmann et al., 1995). Segundo dado do banco de dados Swiss-Prot, a isoforma menos ácida da HSP73 tem aproximadamente 70871Da e $pI=5.37$, da HSP60 tem aproximadamente 57935Da e $pI=5.35$ e da HSP72 tem aproximadamente 70176Da e $pI=5.53$. A HSP73 e a HSP60 formam padrão típico que facilita a identificação. O padrão se dá pela presença de três pontos (isoformas) de cada proteína, que ocorre devido a fosforilações. Quando a proteína é fosforilada, seu pI se torna mais ácido. A HSP72 também apresenta esta característica (Hernando e Manso, 1997), mas não foi possível visualizar dois dos três “spots” correspondentes por estarem em menor quantidade.

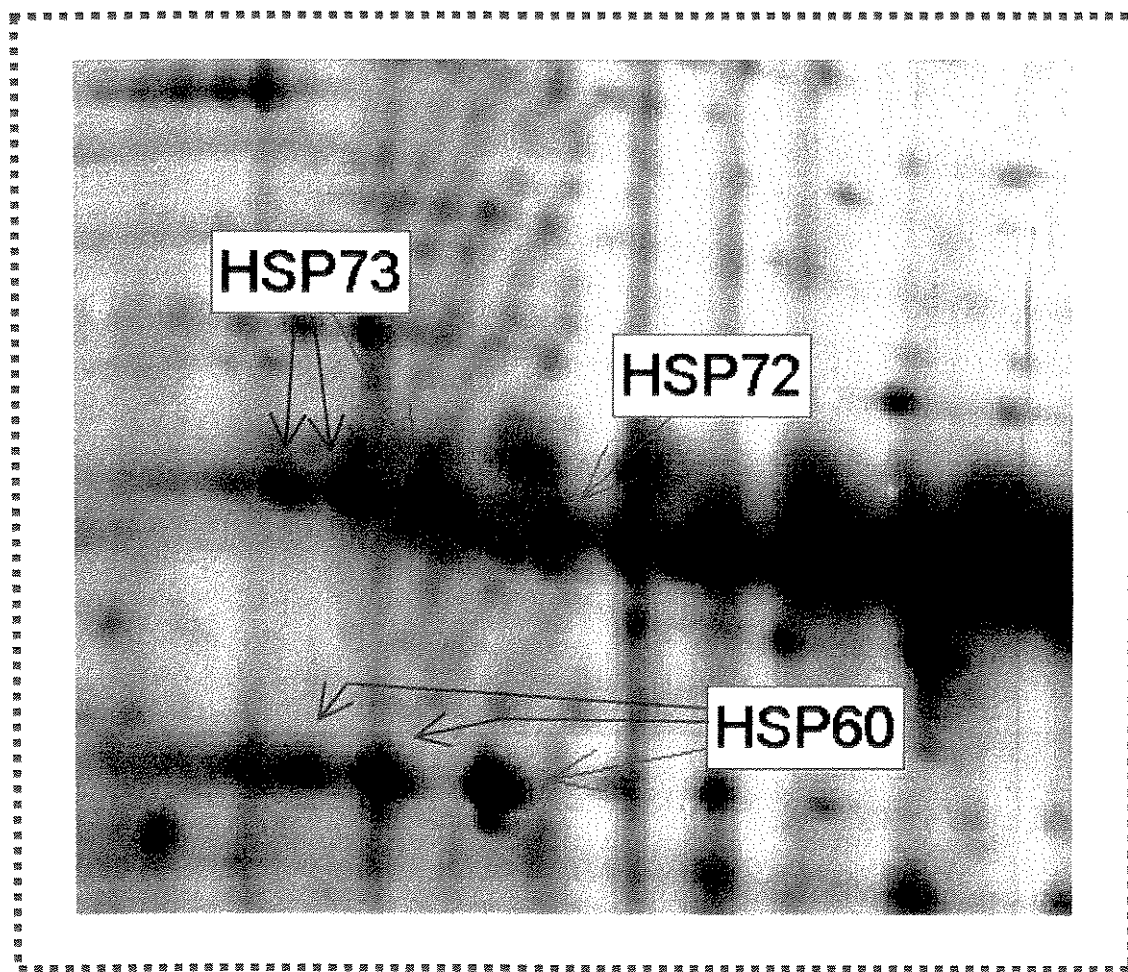


FIGURA 12: Ampliação (500%) da área demarcada na Figura 11, mostrando os pontos referentes à HSP72, HSP73 e HSP60. Os pontos foram identificados por comparação com os pontos destas HSPs presentes e já identificadas nas 2D-PAGEs de fígado e rim (Witzmann et al., 1995). Segundo dado do banco de dados Swiss-Prot, a isoforma menos ácida da HSP73 tem aproximadamente 70871Da e $pI=5.37$, da HSP60 tem aproximadamente 57935Da e $pI=5.35$ e da HSP72 tem aproximadamente 70176Da e $pI=5.53$.

PARTE III: EFEITO DOS TREINAMENTOS CONTÍNUO E INTERMITENTE E DE EXERCÍCIO INTENSO NA QUANTIDADE DE HSP72 NOS MÚSCULOS SÓLEO E SEMITENDINOSO

Efeito dos treinamentos

O aumento dos níveis de HSPs em músculos esqueléticos de ratos sedentários após exercício intenso já é conhecido (Skidmore, 1995; Hernando e Manso, 1997), porém não há informação sobre o efeito do treinamento físico na quantidade de HSPs.

A Figura 13 mostra que o treinamento contínuo resultou numa diminuição significativa dos níveis de HSP72 no sóleo. Músculos sóleos de ratos submetidos ao treinamento do tipo contínuo apresentaram nível de HSP72, em média, 30% menor do que o encontrado em músculos sóleos de ratos controle. Não foi verificada diferença significativa no nível de expressão da HSP72 do músculo sóleo de ratos submetidos ao treinamento do tipo intermitente em relação ao grupo controle, porém, a média se mostrou 15% maior. Entre ratos treinados pelo protocolo contínuo e intermitente, houve diferença significativa dos níveis de expressão de HSP72 do músculo sóleo, sendo que ratos treinados pelo protocolo intermitente apresentaram, em média, nível 64% maior do que ratos treinados pelo protocolo contínuo.

Na Figura 14 é possível observar que, no músculo semitendinoso, esse perfil se alterou. Houve redução significativa de 50%, em relação ao controle, dos níveis de HSP72 após treinamento intermitente. Após treinamento contínuo, a média dos níveis de HSP72 no músculo semitendinoso não foi significativamente diferente das médias dos níveis encontrados em ratos controle e em ratos submetidos ao treinamento intermitente.

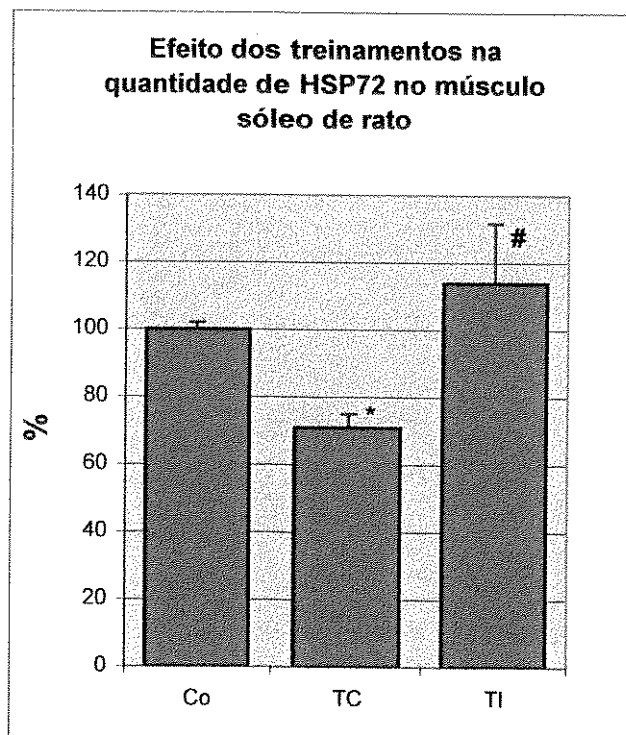


FIGURA 13: Quantidade de HSP72 no músculo sóleo de ratos dos grupos controle (Co), treinado contínuo (TC) e treinado intermitente (TI). A média da quantidade de HSP72 dos músculos dos ratos controle foi considerado 100%. Os músculos foram retirados para análise pelo menos 48 horas após a última sessão de exercício do treinamento. Resultados são média + desvio padrão (N=3). * $p < 0.05$ comparado com controle. # $p < 0.05$ comparado com TC.

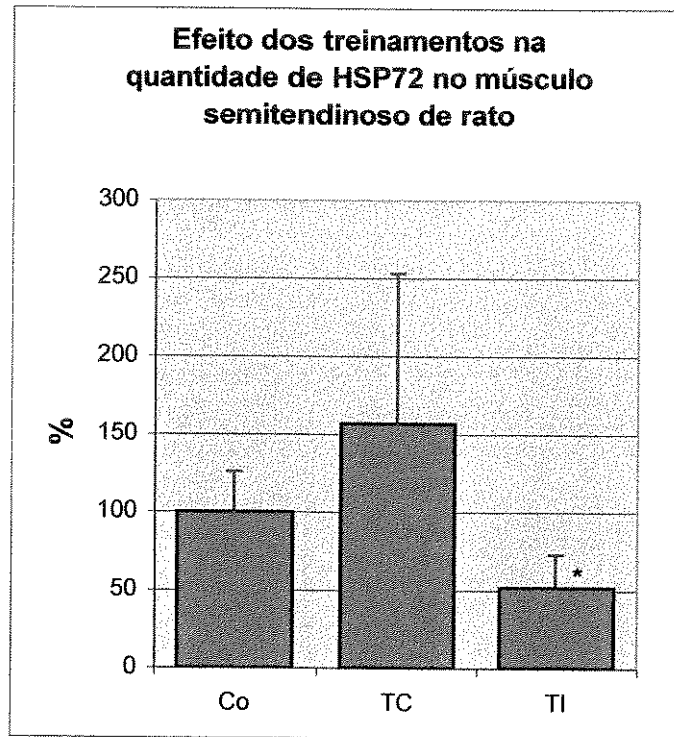


FIGURA 14: Quantidade de HSP72 no músculo semitendinoso de ratos dos grupos controle (Co), treinado contínuo (TC) e treinado intermitente (TI). A média da quantidade de HSP72 dos músculos dos ratos controle foi considerado 100%. Os músculos foram retirados para análise pelo menos 48 horas após a última sessão de exercício do treinamento. Resultados são média + desvio padrão (N=3). * $p < 0.05$ comparado com controle.

Efeito de exercício intenso

Os ratos de cada grupo (Co, TC e TI) foram submetidos ao protocolo de exercício intenso descrito em Materiais e Métodos. Para se analisar o efeito deste protocolo na resposta ao estresse, os músculos foram retirados para as análises 2 horas após o final do protocolo, quando se daria o pico de produção de HSP72 (segundo Hernando e Manso, 1997).

Os resultados (Figuras 15 e 16) demonstram que aumento dos níveis de HSP72 após o protocolo de exercício intenso ocorreu apenas em ratos sedentários. Não houve aumento de HSP72 (nem no sóleo, nem no semitendinoso) em ratos treinados tanto pelo protocolo de treinamento intermitente como pelo contínuo.

Em ratos sedentários (controle), o aumento dos níveis de expressão da HSP72 após exercício intenso foi, em média, de 60% no músculo sóleo e de 200% no músculo semitendinoso.

Após o protocolo de exercício intenso, a média dos níveis de HSP72 dos músculos sóleo e semitendinoso de ratos treinados se mostrou menor em relação à média dos níveis dos ratos não submetidos ao protocolo. Porém, estas reduções não foram significativas.

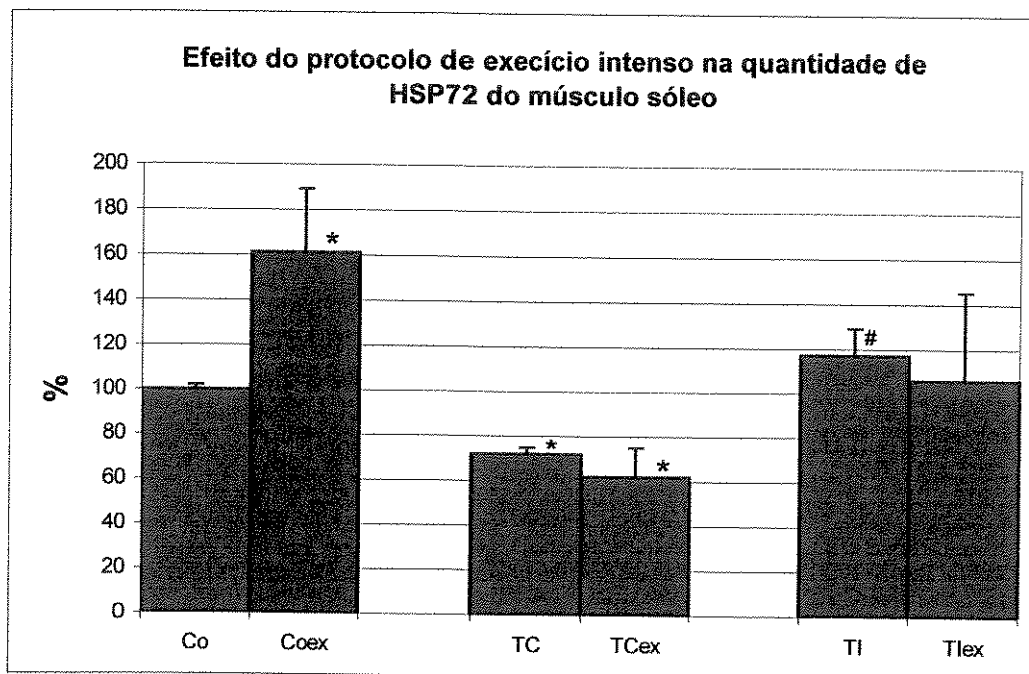


FIGURA 15: Efeito do protocolo de exercício intenso (ex) na quantidade de HSP72 no músculo sóleo de ratos dos grupos controle (Co), treinado contínuo (TC) e treinado intermitente (TI). A média da quantidade de HSP72 dos músculos dos ratos controle foi considerado 100%. Os músculos foram retirados para análise por Western blot pelo menos 48 horas após a última sessão de exercício do treinamento no caso de ratos não submetidos ao protocolo de exercício intenso e exatamente 2 horas após o final do protocolo de exercício intenso no caso de ratos submetidos ao protocolo descrito. Resultados são média + desvio padrão (N=3). * $p < 0.05$ comparado com controle. # $p < 0.05$ comparado com TC.

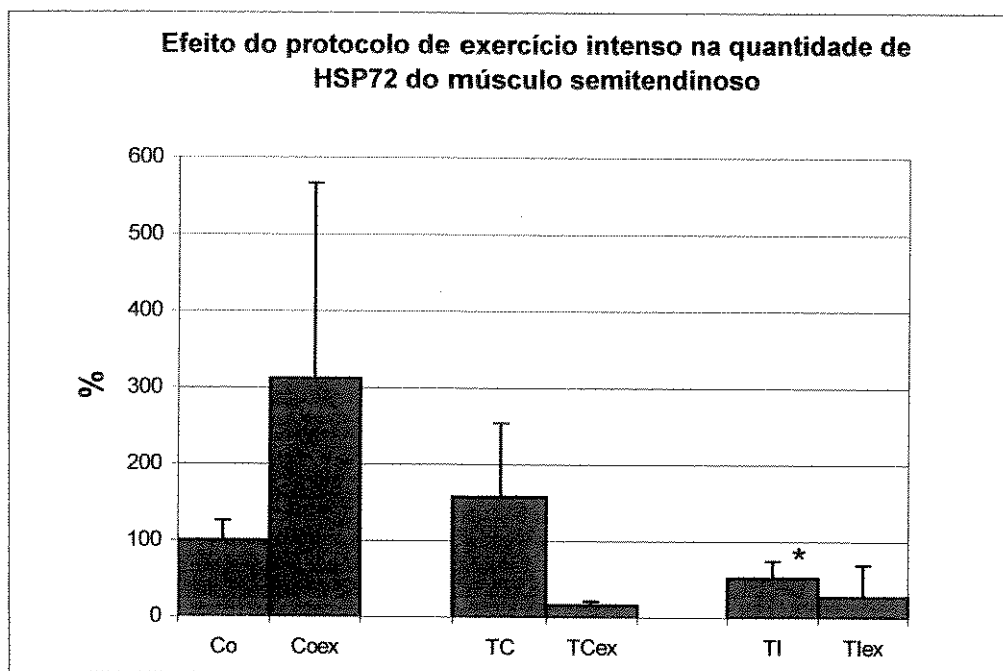


FIGURA 16: Efeito do protocolo de exercício intenso (ex) na quantidade de HSP72 no músculo semitendinoso de ratos dos grupos controle (Co), treinado contínuo (TC) e treinado intermitente (TI). A média da quantidade de HSP72 dos músculos dos ratos controle foi considerado 100%. Os músculos foram retirados para análise por Western blot pelo menos 48 horas após a última sessão de exercício do treinamento no caso de ratos não submetidos ao protocolo de exercício intenso e exatamente 2 horas após o final do protocolo de exercício intenso no caso de ratos submetidos ao protocolo descrito. Resultados são média + desvio padrão (N=3). * $p < 0.05$ comparado com controle. # $p < 0.05$ comparado com TC.

Todas as análises mostradas nesta parte foram feitas em músculos sóleos providos dos mesmos ratos analisados para HSP72. Da mesma forma que as análises da HSP72, os músculos foram retirados para análise pelo menos 48 horas após a última sessão de exercício do treinamento no caso de ratos não submetidos ao protocolo de exercício intenso e exatamente 2 horas após o final do protocolo de exercício intenso no caso de ratos submetidos a este último protocolo.

Efeito dos treinamentos na atividade das enzimas citrato sintase (sistemas oxidativo), glutathiona redutase e catalase (sistema de defesa antioxidante) do músculo sóleo

Na Tabela 4 é possível observar que ambos os treinamentos promoveram aumentos significativos das atividades das enzimas citrato sintase (CS), catalase (CAT) e glutathiona redutase (GR) do músculo sóleo. O aumento da atividade da CS indica aumento da capacidade oxidativa e aumentos da atividade da catalase e da glutathiona redutase indicam aumentos na defesa antioxidante exercida por estas enzimas.

Quando comparado ao treinamento contínuo, o treinamento intermitente resultou em maior aumento da atividade da CS, porém, em menor aumento na atividade das enzimas CAT e GR.

Efeito de exercício intenso na atividade das enzimas citrato sintase (sistemas oxidativo), glutathiona redutase e catalase (sistema de defesa antioxidante) do músculo sóleo

Ainda na Tabela 4, é possível notar que, em ratos sedentários, o protocolo de exercício intenso gerou redução significativa da atividade das enzimas catalase e glutathiona redutase musculares. Isto não ocorreu, após o exercício intenso, em ratos treinados. Não ocorreu diminuição significativa da atividade da citrato sintase do músculo sóleo de ratos sedentários nem de ratos treinados após exercício intenso.

TABELA 4: Efeito dos protocolos de treinamento intermitente (TI) e contínuo (TC) e do protocolo de exercício intenso (ex) na atividade das enzimas citrato sintase, catalase e glutathione redutase do músculo sóleo de ratos. Os músculos foram retirados para as análises pelo menos 48 horas após a última sessão de exercício do treinamento no caso de ratos não submetidos ao protocolo de exercício intenso e exatamente 2 horas após o final do protocolo de exercício intenso no caso de ratos submetidos a este protocolo. Todas as análises mostradas foram feitas em músculos sóleos esquerdos provindos dos mesmos ratos (N=3) analisados para HSP72. dp: desvio padrão. * significativamente diferente do controle (p<0.05). # significativamente diferente de TC (p<0.05). Os dados são de **Cláudio Cesar Zoppi**.

	Citrato sintase (UI/mg de músculo)		Catalase (UI/mg de músculo)		Glutathione redutase (UI/mg de músculo)	
GRUPO	média	dp	média	dp	média	dp
Sedentário	0,026	0,005	0,10	0,010	0,053	0,005
Sedentário (Ex)	0,033	0,005	0,05*	0,010	0,016*	0,011
Treinado contínuo	0,140*	0,026	0,65*	0,043	0,233*	0,015
Treinado contínuo (Ex)	0,130*	0,020	0,68*	0,036	0,220*	0,010
Treinado Intermitente	0,206**	0,015	0,53*	0,049	0,123**	0,011
Treinado Intermitente (Ex)	0,193**	0,015	0,51*	0,034	0,146**	0,005

Foram calculadas as razões da atividade da CS dividida pela atividade da GR ou CAT do músculo sóleo. Quanto maior esta razão, maior seria o efeito deletério das EROs, pois demonstraria uma maior capacidade de produção de EROs para uma menor capacidade antioxidante. A comparação dos dados destas razões (CS/CAT e CS/GR) aos da expressão da HSP72 são mostrados na Figura 17.

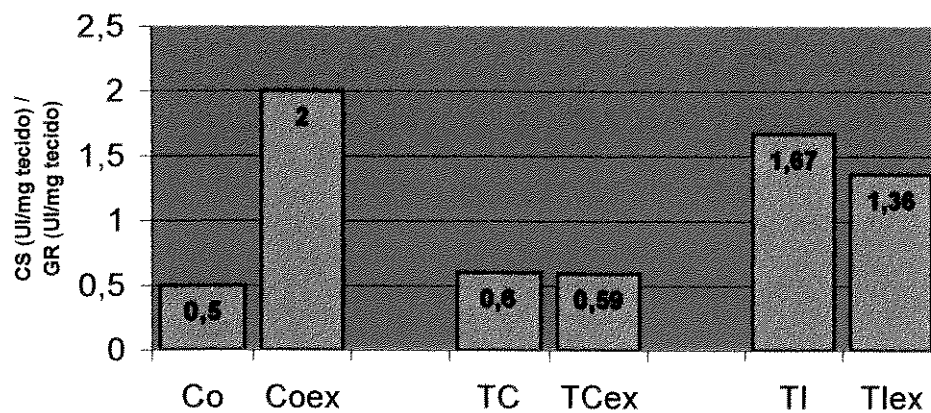
Podemos observar que em ratos sedentários submetidos ao protocolo de exercício intenso, a razão apresenta-se 4 vezes maior. Isto ocorre, principalmente, pela diminuição significativa nos níveis de atividade das enzimas CAT e GR. Em ratos treinados pelo protocolo contínuo, ocorreu decréscimo da razão em relação aos ratos controles devido ao grande aumento da atividade das enzimas CAT e GR. Já em ratos treinados pelo protocolo intermitente, ocorreu grande aumento da atividade da citrato sintase e pequena elevação da atividade das enzimas de defesa antioxidante quando comparado às elevações nos ratos submetidos ao treinamento contínuo. É possível observar que isto resultou em aumento do valor de razão utilizada.

De forma geral, é nítido o paralelismo dos valores desta razão com a quantidade de HSP72. Quanto maior o valor da razão, maior era a quantidade de HSP72 presente no músculo sóleo.

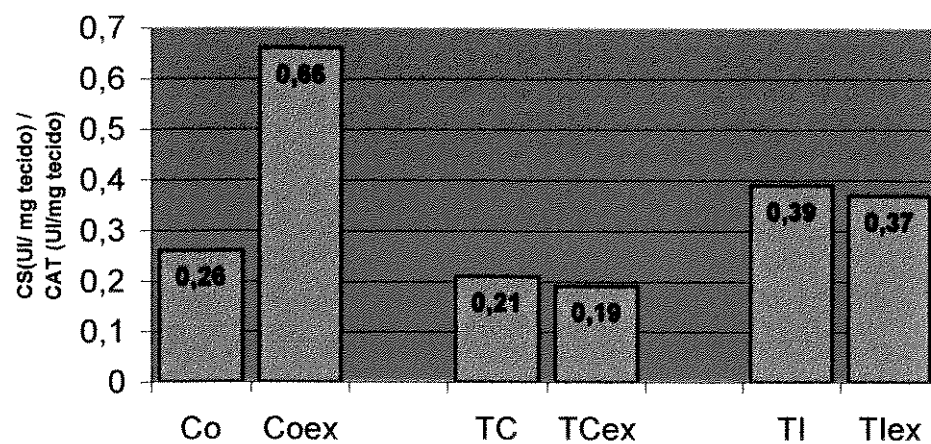
Interconversão de isoformas da cadeia pesada de miosina no músculo sóleo

Após os dois protocolos de treinamento utilizados, não foi detectada interconversão de isoformas de cadeia pesada de miosina nos músculos estudados (**Guilherme A. P. Oliveira – Tese de mestrado**).

Sóleo: CS/GR



Sóleo: CS/CAT



Sóleo: HSP72

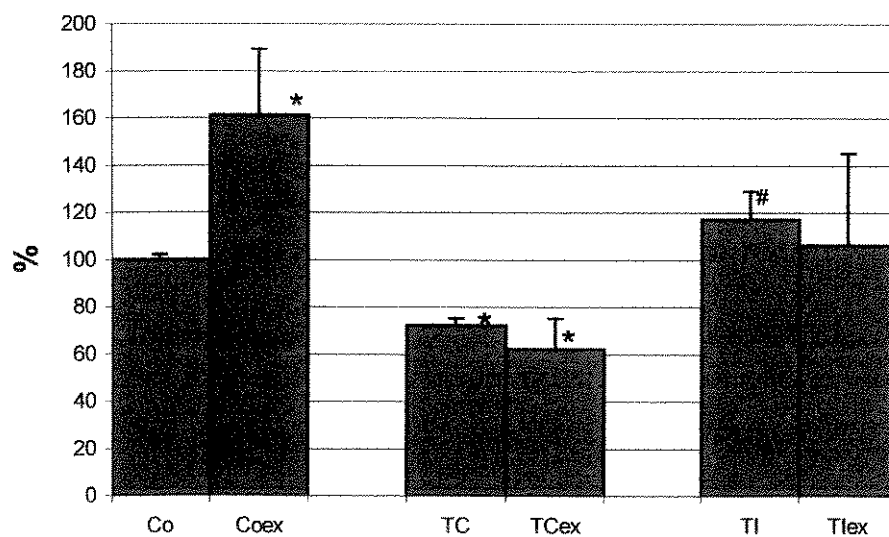


FIGURA 17: Legenda na página 51.

Figura 17 (página anterior): Correlação entre os níveis de expressão de HSP72 e as razões **CS/GR**: atividade da citrato sintase (CS) dividida pela atividade da glutathione redutase (GR); e **CS/CAT**: atividade da CS dividida pela atividade da catalase (CAT). Os dados são referentes ao músculo **sóleo** de ratos dos grupos controle (Co), treinado contínuo (TC) e treinado intermitente (TI) e dos mesmos submetidos ao protocolo de exercício intenso (ex). A média da quantidade de HSP72 dos músculos dos ratos controle foi considerado 100%. Os músculos foram retirados para análise pelo menos 48 horas após a última sessão de exercício do treinamento no caso de ratos não submetidos ao protocolo de exercício intenso, e exatamente 2 horas após o final do protocolo de exercício intenso no caso de ratos submetidos ao protocolo descrito. Resultados são média + desvio padrão (N=3). * $p < 0.05$ comparado com controle. # $p < 0.05$ comparado com TC. Os resultados utilizados para o cálculo das razões foram de **Cláudio Cesar Zoppi**.

DISCUSSÃO

PARTE I: *Ajustes metodológicos*

Alterações em proteínas e falta de reprodutibilidade da preparação poderiam resultar em futuras quantificações incorretas, o que poderia comprometer as análises. Logo, era de suma importância que o método de preparação de amostra fosse o mais reprodutível possível e conferisse o máximo de estabilidade às proteínas. Isto foi alcançado pelo protocolo de preparação de amostra desenvolvido e utilizado neste trabalho.

Ficou claro que a inclusão de DTT na concentração de 0,1M é fator importante para promover estabilidade das proteínas nas amostras. É bem provável que, nesta concentração, o DTT promova maior desnaturação das proteínas, o que inibiria a atividade residual de enzimas proteolíticas e, conseqüentemente, a proteólise. Quando utilizado DTT 0,01M, é possível que atividade residual de enzimas proteolíticas ainda estaria presente, resultando na degradação de proteínas e no efeito de diminuição de bandas do perfil eletroforético.

De fato, tem sido sugerido que a combinação de 2-mercaptoetanol (agente redutor que promove efeito similar ao DTT) com SDS seja eficiente para conferir estabilidade à proteínas em extratos biológicos brutos, possibilitando o armazenamento das amostras por longos períodos (até anos) a -20°C (Gersten, 1996). A grande desvantagem é que não é possível realizar vários ensaios de atividade enzimática, uma vez que muitas enzimas podem perder irreversivelmente sua atividade pela ação do DTT com o SDS.

Uma vez que o objetivo é realizar análises quantitativas de proteínas com o máximo de precisão possível, outro cuidado que deve ser tomado para evitar modificação de proteínas é o de aliquotar as amostras e utilizar cada alíquota apenas uma vez, de modo que sejam submetidas a apenas um ciclo de congelamento e descongelamento. Vários ciclos de congelamento e descongelamento podem causar alterações às proteínas (dado não mostrado).

A preparação das amostras de músculo se mostrou compatível com a técnica de determinação e quantificação de isoformas de cadeia pesada de miosina por eletroforese de longa duração e com a detecção de proteínas de estresse. Desta forma, ambas análises puderam ser feitas a partir das mesmas amostras, resultando numa significativa redução de trabalho e material.

PARTE II: *Caracterização dos músculos*

A determinação e quantificação de isoformas de cadeia pesada de miosina (CPM) possibilitou que os músculos fossem caracterizados quanto à capacidade oxidativa. A CPM I é a isoforma que hidroliza ATP mais lenta e eficientemente e sua presença é proporcional à capacidade oxidativa das fibras (Goldspink, 1996). Quando os músculos de ratos controle são colocados sequencialmente de mais para menos oxidativos (como é mostrado na Figura 7), visualiza-se pelo perfil total que várias proteínas passam a aumentar ou diminuir de quantidade a medida que a capacidade oxidativa do músculo aumenta ou diminui, respectivamente (Figura 8). É um exemplo bem ilustrativo dos vários graus adaptativos de cada músculo, onde o principal fator determinante para a regulação da expressão de muitas proteínas parece ser modulada pela capacidade oxidativa. A expressão de cada proteína pode ser aumentada ou diminuída, o que resultaria em propriedades musculares distintas, como contração rápida ou lenta (Snoj-Cvetko et al., 1996).

TrPx (tioredoxina peroxidase), uma enzima antioxidante com atividade peroxidásica dependente de tiol que limita a ação de EROs, já foi estudada em alguns sistemas como levedura e células de mamíferos (Chae e Rhee, 1994). Informações sobre sua presença em músculos esqueléticos é limitada aos trabalhos de Kim et al., 1989 e Ichimiya et al., 1997, que mostraram que ela está presente em músculo esquelético de rato. Os presentes resultados mostram que esta enzima antioxidante foi detectada nos músculos sóleo, diafragma, extensor digital longo e semitendinoso, apresentando-se em quantidade proporcional à porcentagem de CPM I do músculo, isto é, em maiores quantidades nos músculos mais oxidativos, o que é consistente com o fato desta enzima atuar na defesa antioxidante. Ichimiya et al., 1997, propõe que a expressão desta proteína é especialmente alta em tecidos que metabolizam oxigênio em altos níveis, o que está de acordo com os presentes resultados. O fato de ter sido utilizado anticorpo feito contra TrPx de levedura revela uma grande conservação desta proteína durante a evolução, indício que aponta para a importância desta enzima. São necessários melhores estudos sobre sua atividade e regulação para se saber sua real importância no músculo esquelético.

No que se refere à HSP72, já foi sugerido que músculos (de ratos não estressados) com maiores porcentagens de fibras tipo I apresentam maiores quantidades de HSP72 (Locke et al., 1991). Nos quatro músculos estudados, esta regra parece só não ser verdade para o diafragma, que apresentou menores quantidades. A maior quantidade de HSP72 em músculos mais oxidativos reforça a hipótese da importância da HSP72 na defesa antioxidante.

Utilizando a técnica de eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) foi possível identificar os pontos referentes às HSPs 73, 72 e 60. Notadamente, a HSP72 é a que se encontra em menor quantidade. Isto a torna interessante candidata a biomarcador, uma

vez que estando em pouca quantidade as variações nos níveis de expressão (resultantes de, por exemplo, respostas aos estresses) poderiam ser mais facilmente detectadas pelas técnicas usuais. Quando uma proteína está presente em grande quantidade, a porcentagem de variação resultante da expressão gênica induzida pode ser muito baixa e, assim, não detectada por muitos métodos. Por exemplo, quando a expressão de uma proteína, normalmente presente em número de 100 cópias por célula, é induzida pela síntese de 5 cópias, a variação do nível é de 5%. Porém, se ocorrer a expressão de 5 cópias de uma proteína normalmente presente em número de 10 cópias por célula, a variação do nível é de 50%.

Adicionalmente, os fatos do “turnover” desta proteína ser muito rápido (o que faz com que ela não se acumule) e dela ser, reconhecidamente, a HSP mais fortemente induzida em resposta a vários estresses (Welch, 1992), são outros indicadores da utilidade desta proteína como biomarcador.

PARTE III: EFEITO DOS TREINAMENTOS CONTÍNUO E INTERMITENTE E DE EXERCÍCIO INTENSO NA QUANTIDADE DE HSP72 NOS MÚSCULOS SÓLEO E SEMITENDINOSO

Efeito dos treinamentos

Decréscimo significativo de HSP72 ocorreu no músculo sóleo após treinamento contínuo e no músculo semitendinoso após treinamento intermitente. É de se esperar que um músculo oxidativo (sóleo), contendo mais CPM I e, portanto, a característica de hidrolisar ATP mais lenta e eficientemente por longos períodos, seja mais adaptado para realizar exercício do tipo contínuo, de menor intensidade e maior duração. Um músculo glicolítico (semitendinoso), contendo mais CPM IIb, com a característica de hidrolisar ATP rapidamente por pouco tempo, já estaria mais adaptado para realizar um exercício intermitente, de maior intensidade e menor duração.

Parece óbvio o fato do nível de estresse à que um músculo está sendo submetido ser relacionado ao estado adaptativo do músculo e ao tipo de exercício realizado. Desta forma, os presentes dados reforçam a interpretação de que a quantidade de HSP72 é proporcional ao nível de estresse. No caso do treinamento do tipo contínuo, o músculo sóleo estaria mais adaptado ao exercício sendo realizado e, conseqüentemente, sofreria um nível de estresse menor e exibiria menor quantidade de HSP72 do que o semitendinoso, músculo menos adaptado ao treinamento contínuo e, assim, sofrendo maior estresse. O fato oposto detectado no treinamento intermitente, mostraria que o músculo semitendinoso estaria sofrendo menor estresse do que o músculo sóleo neste tipo de treinamento. Músculos sofrendo maior nível de estresse necessitariam maiores níveis de HSP72 para prover maior proteção adicional.

A análise das atividades da citrato sintase (CS), catalase (CAT) e glutathiona redutase (GR), realizada no músculo sóleo, fornece interessantes embasamentos para esta discussão. A atividade da CAT e GR aumentou mais após treinamento contínuo do que após treinamento intermitente. Concomitantemente, a atividade da CS aumentou mais após treinamento intermitente do que após treinamento contínuo. Com isso, a razão CS/GR e CS/CAT no músculo sóleo ficou relativamente baixa após treinamento contínuo e alta após treinamento intermitente.

A idéia de que quanto maior esta razão, maior seria o efeito deletério das EROs, pois demonstraria uma maior capacidade de produção de EROs para uma menor capacidade antioxidante, reforça a sugestão de que o músculo sóleo estaria apresentando maiores níveis de estresse oxidativo após treinamento intermitente e, assim, requerendo mais HSP72 para combater os efeitos deletérios das EROs às proteínas.

Estes resultados demonstram pela primeira vez que o estímulo do treinamento de exercício físico pode alterar níveis de HSP72 no músculo esquelético e que esta alteração é dependente do tipo do treinamento e do estado adaptativo do músculo.

Efeito de exercício intenso

A finalidade da utilização do mesmo protocolo de exercício intenso tanto para ratos treinados como para ratos controle (sedentários) foi a de analisar como os diferentes grupos responderiam ao mesmo estímulo. O impacto em ratos sedentários foi muito mais estressante do que em ratos treinados. Isto pôde ser visualmente constatado ao final do protocolo, quando ratos sedentários não aguentavam mais correr (uma situação típica de exaustão) e ratos treinados ainda se mostravam dispostos a continuar correndo. Submetendo todos os grupos ao mesmo estímulo, foi possível avaliar isoladamente o efeito das adaptações ao treinamento nas respostas dos músculos ao protocolo descrito. Vários trabalhos (analisando outros marcadores) têm utilizado protocolos diferentes para animais sedentários e treinados no âmbito de levar os ratos de todos os grupos à exaustão. Isto não permite isolar o fator “treinamento” para comparação das respostas ao exercício, pois o protocolo de exercício é diferente para cada grupo.

Aumento dos níveis de HSP72 após protocolo de exercício intenso ocorreu apenas em ratos sedentários. Não houve aumento de HSP72 (nem no sóleo, nem no semitendinoso) nos ratos treinados, independentemente do tipo de treinamento feito. Como o treinamento foi o único fator diferencial entre o grupo controle e os grupos treinados, é possível afirmar que as adaptações resultantes dos treinamentos foram responsáveis pelo não aumento da HSP72 e por tornar o músculo mais capacitado a resistir ao estresse imposto pelo exercício. Esta parece ser uma situação típica de atenuação, onde um estímulo que resultou em aumentos dos níveis de HSP72 em músculos de sedentários passou a não mais resultar neste efeito em músculos treinados, mostrando que algum processo adaptativo deve ter ocorrido.

O aumento da quantidade de HSP72 observado no músculo sóleo de ratos sedentários após exercício intenso está de acordo com os resultados obtidos por Hernando e Manso (1997). Quanto ao semitendinoso, não há informações da literatura para comparações.

Novamente, os resultados das análises das atividades das enzimas CS, CAT e GR fornecem importantes subsídios para a discussão. As adaptações de aumento dos níveis de atividade das enzimas antioxidante CAT e GR no músculo sóleo de ratos treinados poderiam explicar a ausência de aumento da HSP72 após exercício intenso. Essig e Nosek (1997) sugeriram que dado o potencial das EROs de danificar proteínas intracelulares durante contrações musculares, a capacidade do sistema de defesa antioxidante pré-existente poderia ser complementada pela síntese de HSPs. No presente caso, isto parece acontecer em ratos sedentários, porém, em ratos treinados, a capacidade do sistema de defesa antioxidante pré-existente estaria tão alta que o ataque oxidativo das EROs estaria sendo combatido com eficácia e, assim, a ação das HSPs não seria necessário.

Estresse oxidativo e HSP72

Danos intracelulares induzidos por EROs têm sido sugerido como agente causador da fadiga muscular e lesão após exercício (Davies et al., 1982; Sen, 1995; Essig e Nosek, 1997). É interessante notar que somente ratos sedentários submetidos ao protocolo de exercício intenso apresentaram diminuição significativa da atividade das enzimas CAT e GR musculares. É possível que este decréscimo de atividade seja resultado de ataque oxidativo.

Sabe-se que oxidantes como o radical hidroxila e o radical peroxil podem fragmentar e realizar “cross-link” de proteínas. Proteínas oxidativamente modificadas são seletivamente degradadas por proteassomos (Stadtman, 1992). Componentes de proteínas, como metionina, triptofano, histidina e resíduos sulfidrilas, que são críticos para a função de proteínas, são altamente sensíveis ao dano oxidativo (Sen, 1995). É nítido, então, que o ataque de EROs pode inativar e degradar enzimas, o que poderia resultar no efeito observado de abaixamento da atividade das enzimas CAT e GR. Porém, relevante dano oxidativo realmente ocorre no músculo de ratos sedentários após exercício intenso?

Experimentos evidenciando que músculos de ratos sedentários submetidos a exercício intenso sofrem importantes danos oxidativos têm se baseado, principalmente, na análise de peroxidação lipídica. Tem sido observado aumento de TBARS (marcador de peroxidação lipídica) em músculos esqueléticos de ratos sedentários após exercício exaustivo e, ainda, que o treinamento à resistência diminui a suscetibilidade do músculo à peroxidação lipídica (revisado por Sjodin et al., 1990). Apesar de ser um assunto importante, a oxidação de proteínas induzida por exercício têm sido muito pouco estudada. Somente em 1992, Reznick et al. reportaram a primeira evidência de que exercício exaustivo aumenta oxidação de proteínas de músculo esquelético de rato. Outra evidência de estresse oxidativo após exercício é o observado aumento de glutathiona reduzida (Ji et al., 1992).

É interessante o fato de que os trabalhos que analisaram as atividades de enzimas antioxidantes musculares utilizando o modelo de exercício físico não constatarem decréscimo da atividade, diferentemente dos resultados aqui apresentados. No trabalho de Ji et al. (1993), foram analisadas as atividades das mesmas enzimas GR e CAT, além da glutathiona peroxidase e superóxido dismutase, em músculos de ratos e não foi detectada redução. Porém, as análises foram feitas logo após o exercício, diferentemente das presentes análises que foram feitas 2 horas após. A cinética do dano oxidativo às proteínas poderia ser a explicação para a diferença dos dados.

Apesar de não utilizar o modelo de exercício físico, o experimento de Nagasawa et al. (1997) fornece pistas sobre a cinética de oxidação de proteínas em músculo esquelético de ratos. Foi injetado o composto sintético ácido nitrilotriacético, um reconhecido indutor de estresse oxidativo, em ratos e, então, analisou-se a quantidade de proteínas carboniladas no músculo sóleo

0, 1.5, 3 e 6 horas depois. Os resultados indicam que o pico de quantidade de proteínas carboniladas se dá 3 horas depois. Adicionalmente, tem sido demonstrado que a velocidade de degradação de proteínas contráteis é diminuída durante o exercício, mas é aumentada durante o período de recuperação (Dohm et al., 1987). Experimentos com peroxidação lipídica no modelo do exercício físico intenso também indicam que o dano oxidativo vai aumentando até algumas horas após o estímulo estressante (Sjodin et al., 1990). Ensaios similares aos de Nagasawa et al., porém feitos após exercício físico intenso, poderiam ser importantes para uma maior elucidação dos mecanismos e da cinética do dano oxidativo às proteínas resultante do exercício intenso.

Qual seria a relação entre os danos causados pelas EROs e a indução para a síntese de HSP72 observada em ratos sedentários após exercício intenso? Sabe-se que, por ação de EROs, aminoácidos hidrofóbicos podem ser expostos para o exterior da estrutura protéica (Giulivi et al., 1994). Foi proposto que o aumento da exposição de amino ácidos hidrofóbicos seria um sinal simples e universal para a degradação seletiva, por proteassomos, de proteínas celulares danificadas oxidativamente (Pacifici et al., 1993; Giulivi et al., 1994; Grune et al., 1995). Porém, sabe-se que a HSP72 também reconhece resíduos hidrofóbicos em proteínas. Desta forma, ela se ligaria às proteínas atacadas pelas EROs, possibilitando trimerização dos fatores HSF. Como consequência, ocorreria ativação da transcrição, síntese de HSPs e, então, reparo e proteção às proteínas celulares. Este modelo explica bem a relação da ativação transcricional da HSP72 com o estresse oxidativo e como a defesa antioxidante pode ser suplementada pela ação das HSPs em situação em que as enzimas antioxidantes pré-existent não suportam o ataque oxidativo. Na prática, estudos utilizando o músculo cardíaco mostraram que a HSP72 pode ser induzida por estresse oxidativo e que a indução de HSP72 (sem concomitante aumentos das atividades de enzimas antioxidantes) por hipertermia ou oxidantes está relacionada à resistência do coração à eventos de isquemia-reperfusão (Turrens et al., 1992; Kukreja et al., 1994; Locke et al., 1995).

A diminuição na atividade da CAT e GR, provavelmente resultado de ataque oxidativo de EROs às proteínas, coincide com aumentos da HSP72 e é consistente com o fato de que este mecanismo de reparo de proteínas é ativado por proteínas desnaturadas (inativadas).

Em ratos treinados, os níveis elevados das enzimas antioxidantes pré-existent, e outras possíveis adaptações, evitariam o ataque oxidativo das EROs às proteínas, evitando o efeito proteotóxico e garantindo a integridade das proteínas celulares. Como consequência, o mecanismo de defesa das HSPs não seria acionado. Como citado anteriormente, os vários trabalhos com peroxidação lipídica indicam que o dano oxidativo às membranas celulares de fibras musculares após exercício intenso é reduzido após programas de treinamento à resistência (Sjodin et al., 1990). Estes resultados suportam os resultados da presente tese. A diminuição da suscetibilidade à peroxidação lipídica e a não expressão da HSP72 em ratos treinados poderiam

estar relacionada com o aumento da atividade das enzimas de defesa, que resultaria em menor ataque oxidativo às proteínas e membranas celulares.

Em ratos sedentários submetidos ao exercício intenso, a não diminuição da atividade da CS, quando a atividade da CAT e GR abaixa, é difícil de ser explicada. Embora muito pouco se saiba sobre o assunto, um recente trabalho mostra dados interessantes que poderiam explicar este fenômeno. Polla et al. (1996), por análises morfológicas e funcionais, demonstraram de forma bastante elegante que HSPs protegem seletivamente a mitocôndria do dano oxidativo. Foi observado que a proteção se correlaciona melhor com a expressão da HSP72 e que a mitocôndria é mais protegida do que outros componentes celulares como DNA ou membranas. Como enzima essencialmente mitocondrial, a CS poderia estar sendo seletivamente protegida quando comparado às enzimas CAT e GR, predominantemente presentes em peroxissomos e citosol, respectivamente (Byung, 1994).

Por comparações entre o perfil de expressão da HSP72 e as razões CS/CAT e CS/GR no músculo sóleo, parece que o mecanismo de ação da HSP72 não é apenas emergencial, mas também funciona constitutivamente. Tal proposição é levantada pela visível manutenção da relação proporcional “HSP72-razão” entre os grupos treinado contínuo (TC) e treinado intermitente (TI): TC exibe menor razão e menores níveis de HSP72; TI exibe maior razão e maiores níveis de HSP72. Esta é uma situação onde não está ocorrendo uma resposta ao estresse. Com isso, a HSP72 poderia ser regulada de duas formas, uma indutiva, pela rápida síntese em situações de estresse, e outra constitutiva, pela constante regulação pelo nível do balanço oxidativo. Tais correlações não foram demonstradas ainda na literatura.

No músculo sóleo, o estresse oxidativo parece ser um fator de estresse preponderante, explicando as correlações observadas. Em músculos com diferentes capacidades oxidativas, análises do perfil total, das isoformas de CPM, da enzima tioredoxina peroxidase, da HSP72 e outros exemplos da literatura, como quantidade de glutathione total (Ji et al., 1992), superóxido dismutase (Powers et al., 1994), glutathione peroxidase (Ji et al., 1992; Powers et al., 1994), isoformas de cadeia leve de miosina, tropomiosina e troponina (Barany et al., 1995), deixam claro o fato da capacidade oxidativa ser fator de grande influência na regulação de expressão das proteínas musculares, tanto em termos de quantidade de proteína como dos tipos de isoformas.

Segundo Storz e Polla (1996), parece que a regulação REDOX é um importante mecanismo de controle de ativação de fatores de transcrição. A expressão de muitos genes pode ser induzida por alterações na concentração de EROs, sugerindo que células desenvolveram mecanismos para “sentir” EROs e que o estresse oxidativo é um sinal importante para a resposta adaptativa de músculos esqueléticos à alterações de demandas funcionais.

HSP72 faz parte da defesa antioxidante?

O envolvimento da HSP72 no combate aos efeitos do ataque oxidativo às proteínas é um assunto pouco abordado. Sua relevância neste processo e os exatos mecanismos de ação ainda necessitam maiores estudos. De qualquer forma, os estudos com músculo cardíaco mostram inegáveis evidências da necessidade de sua indução para conferir resistência ao estresse oxidativo, o que levanta a questão de se a HSP72 deve ser considerada parte da defesa antioxidante.

Davies (1988) e Byung (1994) propuseram um esquema para classificação dos sistemas de defesa antioxidante que oferece grande versatilidade e parece ser propício para a questão citada. Eles propõe uma divisão entre defesas primárias e secundárias.

As defesas primárias incluiriam:

- (1) Compostos antioxidantes como as vitaminas E, A e C, glutathione e ácido úrico;
- (2) Enzimas antioxidantes (do tipo “scavenging”) como superóxido dismutase, catalase e peroxidases.

Como defesas secundárias, eles propuseram:

- (1) Enzimas lipolíticas, fosfolipases, enzimas proteolíticas, proteases, peptidases, enzimas de reparo de DNA, endonuclease, exonuclease e ligase.

Byung ainda propôs que quando a primeira linha de defesa (antioxidantes primários) não protege completamente contra o ataque de EROs, algum dano ocorre que precisa ser cuidado pelos antioxidantes secundários, que eliminariam ou reparariam moléculas danificadas. Embora não citadas, as HSPs parecem se encaixar perfeitamente no grupo de defesas secundárias. Como já discutido anteriormente, os dados obtidos nesta tese são bastante consistentes com esta idéia. As enzimas catalase e glutathione redutase representariam os antioxidantes primários, que no caso de ratos sedentários submetidos ao exercício intenso, não suportariam combater completamente o ataque oxidativo. Os danos oxidativos resultantes induziriam a rápida expressão da HSP72 que teria a função de reparar proteínas danificadas.

Em suma, parece que a HSP72 deve ser considerada parte da defesa antioxidante, representando uma linha secundária de defesa.

HSP72 e adaptação

Muitos dos benefícios resultantes do exercício podem ser atribuídos às adaptações ocorridas no músculo esquelético. Apesar da extensa caracterização das mudanças induzidas pelo treinamento físico na utilização de substrato, conteúdo de mitocôndrias, densidade capilar e no perfil de enzimas e proteínas contráteis, surpreendentemente pouca informação existe sobre os eventos moleculares responsáveis por iniciar e manter o processo adaptativo. Por exemplo, apesar de ser claro que o processo adaptativo requer alteração da expressão gênica, não se sabe quando

o estímulo molecular para a adaptação é sentido pela miofibrila, quanto tempo o estímulo persiste ou como repetidos exercícios produzem o efeito que caracteriza o estado treinado (Neufer et al., 1998).

Recentes resultados têm sugerido que as adaptações induzidas pelo treinamento à resistência em músculos esqueléticos podem ser resultado dos efeitos cumulativos de alterações temporárias na expressão gênica induzidas durante o período de recuperação após cada sessão de exercício (Neufer et al., 1998). Com isso, as alterações demoradas refletiriam os efeitos cumulativos das alterações temporárias na expressão gênica. Produtos gênicos com meia-vida relativamente longa (proteínas mitocondriais e contráteis) mostrariam um pequeno aumento de uma sessão de exercício para a outra, aonde produtos gênicos com meia-vida relativamente curta (HSP72) não acumulariam entre sessões de treinamento físico.

A HSP72 é uma proteína que tem sua expressão aumentada a partir de 2 horas após o exercício. A função desta proteína é compatível com sua participação no processo de remodelamento adaptativo das miofibrilas esqueléticas. Foi sugerido que aumentos da quantidade de HSP72 se correlacionam com aumentos da eficiência e capacidade traducional, sendo provável que expressão da HSP72 seja requerida para suportar a síntese, “folding”, e a translocação de proteínas nascentes durante o processo adaptativo do músculo esquelético ao exercício (Neufer et al., 1996).

É interessante a idéia de que aumentos da síntese da HSP72 poderiam marcar as fibras sendo induzidas ao processo adaptativo. Como mostrado, aumento da HSP72 em ratos sedentários indicaria que o protocolo de exercício era suficiente para gerar adaptação. O fato da atividade da catalase e da glutatona redutase estarem baixos e ainda reduzirem após o exercício mostraria a necessidade da fibra de se adaptar. Em ratos treinados, o protocolo não resultou em aumentos da HSP72, indicando que o exercício não seria suficiente para induzir o processo adaptativo. Isto pode ser sustentado pelo fato dos ratos treinados não estarem em condição típica de exaustão ao final do protocolo e da atividade das enzimas CAT e GR se manterem altos, o que indicaria que não haveria necessidade ou “sinalização” para a adaptação.

Ainda, a HSP72 é considerada sensor proteotóxico e, assim, estaria envolvida na transdução do sinal do estímulo de proteotoxicidade. Desta forma, é possível imaginar que esta proteína poderia representar a ligação entre o **sinal e a resposta adaptativa**.

Interconversão de isoformas da cadeia pesada de miosina no músculo sóleo

Após os dois protocolos de treinamento utilizados, não foi detectada nenhuma conversão de isoformas de CPM nos músculos estudados (Guilherme A. P. Oliveira – Tese de mestrado). Talvez a intensidade e, principalmente, a duração dos treinamentos não tenham sido suficientes para promover esta adaptação pelo fato do processo de conversão ser lento. O processo de

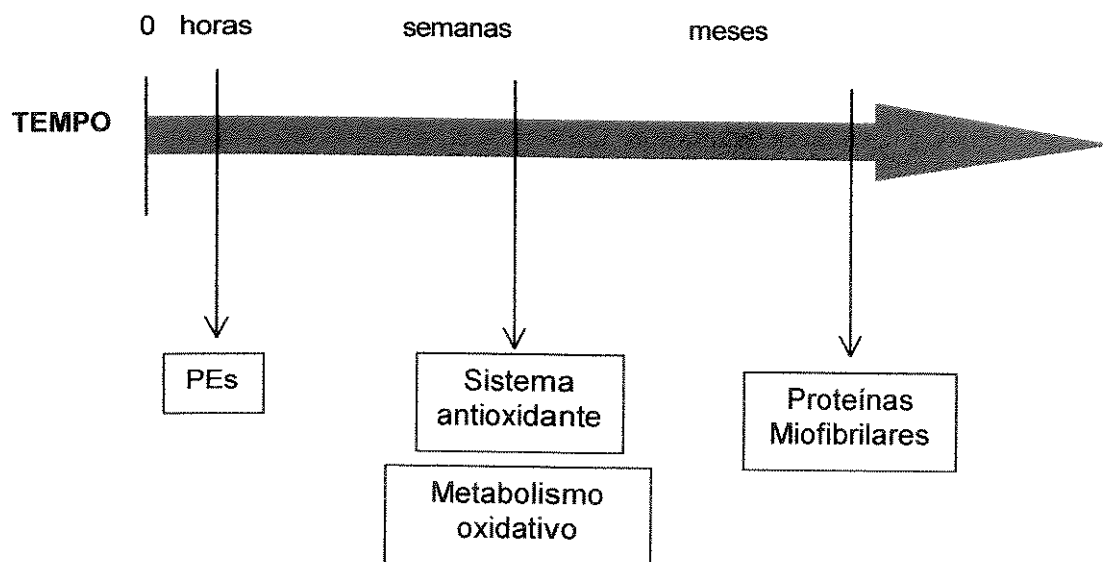
conversão de fibras não envolve só a síntese da nova isoforma como a degradação de antiga. A degradação protéica exerce uma importante função regulatória no remodelamento dos filamentos de miosina, pois as isoformas recém sintetizadas só podem ser inseridas no sarcômero depois que as isoformas não mais expressas sejam retiradas e degradadas. É possível que as isoformas recém sintetizadas sejam mais passíveis de degradação quando na forma livre do que quando já inseridas no filamento. Um maior “turnover” das novas isoformas seria o resultado desta condição. É plausível que isto funcionaria para prevenir a fibra muscular de mudar sua composição de isoformas de miosina prematuramente, logo, um estímulo teria que durar tempo suficiente para que houvesse o efeito tanto das rápidas mudanças transcricionais e traducionais como do demorado processo de proteólise (Termin e Pette, 1992).

Modelo temporal de adaptação ao treinamento à resistência

Sempre buscando uma situação de maior economia com o máximo de eficiência possível, o processo adaptativo deve estar em sintonia com as exigências funcionais à que o músculo está sendo submetido. Num treinamento à resistência que leve à adaptação do organismo, é de se esperar que sejam fundamentais as seguintes decisões adaptativas no músculo:

- (1) Evitar efeito deletério de estresse do exercício (proteínas de estresse);
- (2) Ajustar a melhor forma de geração de ATP (sistema de produção de energia);
- (3) Evitar toxicidade das espécies reativas de forma econômica (sistema de defesa antioxidante);
- (4) Escolher a melhor forma de conversão ATP-movimento (sistema miofibrilar);

Pelos resultados aqui apresentados e por outros da literatura, é proposto aqui situar as adaptações citadas na seguinte escala temporal:



PERSPECTIVAS

A complementação das análises nos músculos extensor digital longo e semitendinoso está sendo feita para se analisar a real importância das HSPs na defesa antioxidante e no controle da resposta adaptativa. Além disso, serão promovidas alterações nos dois tipos de protocolos de treinamento para se verificar qual seria a modulação desse biomarcador quando os ratos forem submetidos a um treinamento que lesione seriamente os músculos.

Uma vez que a HSP72 parece estar envolvida com o processo da adaptação e seu nível de expressão ser proporcional ao estresse sofrido, estudos para a determinação do nível de HSP72 que indique o máximo de adaptação com o mínimo de lesão possível poderia ser uma idéia interessante para ser aplicada ao monitoramento do treinamento de atletas. Há, porém, a dificuldade de frequentes coletas de biópsias de músculo em humanos. Talvez, avanços nas técnicas de retirada das biópsias musculares possam ser uma saída.

Adicionalmente, estudos estão sendo iniciados no sentido de rastrear a HSP72 em sangue e, para isso, os leucócitos estão sendo as células alvo (são células nucleadas que têm a capacidade de responder adaptativamente). Resultados preliminares indicam elevação dos níveis de HSP72 em leucócitos de ratos submetidos ao exercício físico intenso, este índice de estresse também poderá se mostrar útil para o monitoramento de treinamentos físicos.

TRABALHOS EM CONGRESSOS E PUBLICAÇÕES

Apresentações em congressos

Oliveira GA, **Smolka MB**, Novello JC, Pereira-da-Silva L e Macedo DV. "Padronização da Técnica de Eletroforese em Gel de SDS Poliacrilamida para os Diferentes Tipos de Fibras Musculares" XII Reunião Anual de Federação de Sociedades de Biologia Experimental-27 a 30 de agosto de 1997).

Smolka MB, Netto LES, Rhee SG, Novello JC. "Thioredoxin peroxidase levels in different skeletal muscles" IX BIENNIAL MEETING INTERNATIONAL SOCIETY FOR FREE RADICAL RESEARCH, São Paulo, SP, Brazil. 7 a 11 de setembro de 1998. (Revista de farmácia e bioquímica da universidade de São Paulo).

Smolka MB, Marangoni S, Pereira-da-Silva L, Macedo DV, Novello JC. "Diaphragm stress response to exhaustive exercise" IX BIENNIAL MEETING INTERNATIONAL SOCIETY FOR FREE RADICAL RESEARCH, São Paulo, SP, Brazil. 7 a 11 de setembro de 1998. (Revista de farmácia e bioquímica da universidade de São Paulo).

Braga R, **Smolka M**, Marangoni S, Macedo D, Novello J. (Selecionado para apresentação oral). "Stress proteins as biomarkers in leucocytes" XXIII INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD APHERESIS ASSOCIATION – WAA E CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA (HEMO98), Outubro, 1998.

Publicações

"Soleus adaptations to exercise training and intensive exercise indicates that HSP72 can function as a complement of the pre-existence enzymatic antioxidant system". A ser submetido para o "American Journal of Physiology".

Um trabalho similar feito com um músculo glicolítico, o semitendinoso, também será submetido. Estas análises estão em fase de conclusão.

Palestra

"Adaptações musculares: uma visão bioquímica". Palestra conferida aos alunos de pós-graduação da Faculdade de Educação Física. 26 de Outubro de 1998.

REFERÊNCIAS

- Adams, G. R., Hather, B. M., Baldwin, K. M. e Dudley, G. A. (1993) Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance-training. *J. Appl. Physiol.* **74**, 911-915.
- Ahlborg, B., Bergstrom, J., Ekelund, L. G., Hultman, E. (1967) Muscle glycogen and muscle electrolytes during prolonged physical exercise. *Acta Physiol. Scand.* **70**, 129-142.
- Alessio, H.M. (1993). Exercise-induce oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**: 218-224.
- Alexander, M. e Goldspink, G. (1977) Mechanics and energetics of animal locomotion. London, Chapman & Hall. Ch. 1. Design of muscles in relation to locomotion, pp 1-20. Muscle energetics. Ch. 6. Energy cost of locomotion, pp 153-165.
- Applegate, L.A., Luscher, P., e Tyrell, R.M. (1991) Induction of heme oxygenase: A general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res.* **51**, 974-978.
- Ausoni, S., Gorza, L., Schiaffino, S., Gundersen, K. e Lomo, T. (1990) Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J. Neurosci.* **10**, 153-160.
- Balon, T.W. e Nadler, J.L. (1994) Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J.Appl.Physiol.* **77**: 2519-2521.
- Barany, M. J. (1967) ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *General Physiology* **50**, 197-218.
- Barany, K., Barany M. e Giometti, C. (1995) Polyacrylamide gel electrophoretic methods in the separation of structural muscle proteins. *J. Chromatography* **698**, 301-332.
- Becker, J. e Craig, A. (1994) Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* **219**, 11-23.
- Beckman, J.S., Beckamn, T. e Freeman, B. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1620-1624.
- Beckmann, R. P., Mizzen, L. A. e Welch, W. J. (1990) Interaction of HSP 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science Wash. DC* **248**, 850-854.
- Bensande, O., Bellier, S., Dubois, M. F., Giannoni, F., Nguyen, V. T. (1996) Heat-shock induced protein modifications and modulation of enzyme activities. *In Stress inducible Celular Responses*. Ed. by Feige, U., Morimoto, R.I., Yahara, I. e Polla, B., 199-219.
- Black, A.R. e Subject, J.R. (1991) Systemic effects of stress: The biology and physiology of the heat shock and glucose-regulated stress protein systems. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* **15**, 126-166.
- Brooks, G. A., Hittelman, K. J., Faulkner, J. A., e Beyer, R. E. (1971) Tissue temperatures and whole-animal oxygen consumption after exercise. *Am. J. Physiol.* **221**, 427-431.
- Borger, D., Jackson, D., Kim, K., Nauerth, M., e Essig, D. (1995) Induction of an oxygen stress protein mRNA in skeletal muscle during recovery from repetitive contractions. *FASEB J.* **9**, A350.

- Burdon, R.H. (1993) Heat shock proteins in relation to medicine. *Molec. Aspects Med.* **14**, 83-165.
- Byung, P.Y. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **74**, 139-162.
- Chae, H.Z. e Rhee, S.G. (1994) A thiol-specific antioxidant and sequence homology to various proteins of unknown function. *Biofactors* **4**, 177-180.
- Coyle, E. F., Sidossis, L. S., Horowitz, J. F. e Beltz, J. D. (1992) Cycling efficiency is related to the percentage of type I muscle fibers. *Med. Sci. Sports Exercise* **24**, 782-788.
- Davies, K. J. A., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A. e Packer, L. (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 1198-1205.
- Davies, K.J.A. (1988) Proteolytic systems as secondary antioxidant defenses. In: *Cellular antioxidant defense mechanisms*, edited by C. K. Chow. Boca Raton, FL: CRC, 25-67.
- Dean, R.T. (1987) A mechanism for accelerated degradation of intracellular proteins after limited damage by free radicals. *FEBS Let.* **220**, 278-282.
- DeNardi, C., Ausoni, S., Moretti, P., Gorza, L., Velleca, M., Buckingham, M. e Schiaffino, S. (1993) Type 2X myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *J. Cell Biol.* **123**, 823-835.
- DiDomenico, B. J., Bugaiski, G. E., e Lindquist, S. (1982) The heat-shock response is regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell* **31**, 593-603.
- Dohm, G.L., Tapscott, E.B. e Kasperek, G.J. (1987) Protein degradation during endurance exercise and recovery. *Med. Sci. Sports. Exerc.* **19**, 166-171.
- Ellis, R. J., van der Vies, S. M. e Hemmingsen, S. M. (1989) The molecular chaperone concept. *Biochem. Soc. Symp.* **55**, 145-153.
- Ellis, R. J., e van der Vies, S. M. (1991) Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 321-347.
- Ernster, L. (1986) Oxygen as an environmental poison. *Chem. Scripta* **26**: 525-534.
- Essig, D.A. e Nosek, T.M. (1997) Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species. *Can. J. Appl. Physiol.* **22(5)**, 409-428.
- Farber, J.L., Kyle, M. e Coleman, JB. (1990) Biology of disease - Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* **62**:670-679.
- Fridovich, I. (1986). Biological effects of superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**: 1-11.
- Gersten, D. (1996) Gel electrophoresis of protein: essential techniques. Wiley.
- Giulivi, C., Pacifici, R.E. e Davies, K.J.A. (1994) Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 329-341.

- Goldhaber, J. (1996) Free radicals enhance $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in ventricular myocytes. *Am.J.Physiol.* **271**: H838-H833.
- Goldspink, G. (1985) Malleability of the motor system: A comparative approach. In Design and performance of muscular systems. Eds C. R. Taylor, E. Weibel and L. Bolis. *Journal of Experimental Biology* **115**, 375-391.
- Goldspink, G., Scutt, A., Loughna, P. T., Wells, D. J., Jaenicke, T., Gerlach, G. F. (1992) Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *Am. J. Physiol.* **262**, R356-363.
- Goldspink, G. (1996) Muscle growth and muscle function: a molecular biological perspective. *Research in Veterinary Science* **60**, 193-204.
- Grune, T., Reinheckel, T., Joshi, M. e Davies, K.J.A. (1995) Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **270**, 2344-2351.
- Gunning, P. e Hardeman, E. (1991) Multiple mechanisms regulate muscle fibre diversity. *FASEB J.* **5**, 3064-3070.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth. Enzymol.* **186**:1-85.
- Hartman, D. e Gething, M. J. (1996) Normal protein folding machinery. In Stress inducible Celular Responses. Ed. by Feige, U., Morimoto, R.I., Yahara, I. e Polla, B., 3-24.
- Hendrick, J.P. e Hartl, F.U. (1993) Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 349-384.
- Herbert, V., Shaw, S., Jayatileke, E., and Stopler-Kasdan, T. (1994) Most free radical injury is iron related: It is promoted by iron, hemim, holoferitin and vitamin C and inhibited by desferoxamine and apoferitin. *Stem Cells* **12**, 289-303.
- Hernando, R. e Manso, R. (1997) Muscle fiber stress in response to exercise. *Eur. J. Biochem.* **243**, 460-467.
- Hess, M.L. e Manson, N.H. (1984) Molecular oxygen: Friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox and ischemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **16**, 969-985.
- Hightower, L.E. (1991) Heat shock, stress proteins, chaperones andproteotoxicity. *Cell* **66**, 191-197.
- Hood, D.A., Kelton, R. e Nishio, M. (1992) Mitochondrial adaptations to chronic muscle use: effect of iron deficiency. *Comp. Biochem. Physiol.* **101^A**, 597-605.
- Horowitz, J. F., Sidossis, L. S. e Coyle, E. F. (1994) High efficiency of type I muscle fibers improves performance. *Int. J. Sports Med.* **15**, 152-157.
- Hughes, S. M., Cho, M., Karsch-Mizrachi, I., Travis, M., Silberstein, L., Leinwand, L. A. e Blau, H. (1993) Three slow myosin heavy chains sequentially expressed in developing mammalian muscle. *Dev. Biol.* **158**, 183-199.

- Ichimiya, S., Davis, J.G., O'rourke, D.M., Katsumata, M. e Greene, M.I. (1997) Murine thioredoxin peroxidase delays neuronal apoptosis and is expressed in areas of the brain most susceptible to hypoxic and ischemic injury. *DNA Cell Biol.* **16(3)**, 311-321.
- Imlay, J.A. and Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**: 1302.
- Iuliano, L.; Violi, F.; Pedersen, J. Z.; Praticò, G. R. e Balsano, F. (1992) Free radical-mediated platelet activation by hemoglobin released from red blood cells. *Arch. Biochem. Biophys* **299**: 220-224.
- Iuliano, L.; Pedersen, J. Z.; Praticò, D.; Rotilio, G. e Violi, F. (1994) Role of hydroxyl radicals in the activation of human platelets. *Eur. J. Biochem* **221**: 695-704.
- Izumo, S., Nadal-Ginard, B. e Mahdavi, V. (1986) All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science Wash.DC* **231**, 597-600.
- Jakobsson, F., Edström, L., Grimby, L. e Thornell, L. E. (1991) Disuse of anterior tibial muscle during locomotion and increased proportion of type II fibres in hemiplegia. *J. Neurol. Sci.* **105**, 49-56.
- Janssen, Y.M.W., Van Houten, B., Borm, P.J.A., and Mossman, B.T. (1993) Biology of disease: Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Invest.* **69**, 261-274.
- Jenkins, R.R. (1988) Free radical chemistry relationship to exercise. *Sports Med.* **5**:156-170.
- Jenkins, R.R. and Goldfarb, A. (1993) Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**: 210-212.
- Ji, L.L., Fu, R. e Mitchell, E.W. (1992) Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J. Appl. Physiol.* **73(5)**, 1854-1859.
- Ji, L.L. (1993) Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25(2)**, 225-231.
- Kilgore, J. L., Timson, B. F., Saunders, D. K. Kraemer, R. R. Klemm, R. D. e Ross, C. R. (1994) Stress protein induction in skeletal muscle: comparison of laboratory models to naturally occurring hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* **76(2)**, 598-601.
- Kim, I.H., Kim, K. e Rhee, S.G. (1989) Induction of na antioxidant protein of *Saccharomyces cerevisiae* by O₂, Fe³⁺, or 2-mercaptoethanol. *Proc. Natl. Acad. Scien.* **86**, 6018-6022.
- Kobzik, L., Reid, M.B., Bredt, D.S. e Stamler, J.S. (1994) Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* **372**, 546-548.
- Kukreja, R.C., Kontos, M.C., Loesser, K.E., Batra, S.K., Qian, Y., Gbur, C.J., Naseem, S.^a, Jesse, R.L. e Hess, M.L. (1994) Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *Am. J. Physiol.* **267**, H2213-H2219.
- Kushmerick, M. J., Meyer, R. A. e Brown, T. R. (1992) Regulation of oxygen consumption in fast-and slow-twitch muscle. *Am. J. Physiol.* **263** (Cell Physiol. 32), C598-C606.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Landry, I., Chretien, P., Lambert, H., Hickey, E. R., Weber, L. A. (1989) Heat-shock resistance conferred by expression of human hsp27 gene in rodent cell. *J. Cell Biol.* **109**, 7-15.
- LeGendre, N. e Matsuidaira, P. (1988) Direct protein microsequence from imobilon-P transfer membrane. *Biotechniques* **6**, 1154-1159.
- Levine, R.L., Oliver, C.N., Fulks, R.M. e Stadtman, E.R. (1981) Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 2120-2124.
- Locke, M., Noble, E. G. e Atkinson, B. G. (1990) Exercising mammals synthesize stress proteins. *Am. J. Physiol.* **258** (Cell Physiol. 27), C723-C729.
- Locke, M., Noble, E. G. e Atkinson, B. G. (1991) Inducible isoform of HSP 70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. *Am. J. Physiol.* **261**, C774-C779.
- Locke, M., Atkinson, B. G., Tanguay, M. R. e Noble, E. G. (1994) Shifts in type I fiber proportion in rat hindlimb muscle are accompanied by changes in HSP 72 content. *Am. J. Physiol.* **266** (Cell Physiol. 35), C1240-C1246.
- Locke, M., Tanguay, R.M., Klabunde, R.E. e Ianuzzo, C.D. (1995) Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP72. *Am. J. Physiol.* **269**, H320-H325.
- Loughna, P. T. , Izumo, S., Goldspink, G. e Nadal-Ginard, B. (1990) Disuse and passive stretch cause rapid alterations in expression of developmental and adult contractile protein genes in skeletal muscle. *Development* **109**, 217-223.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. Farr, A. L. e Rondall, R. J. (1951) Protein measurments with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Margulis, B. A. e Welsh, M. (1991) Isolation of HSP 70 -binding proteins from bovine muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 1-7.
- Morimoto, R.I. (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* **259**, 1409-1410.
- Morimoto, R.I., Kroeger, P.E. e Cotto, J.J. (1996) The transcriptional regulation of heat shock genes: A plethora of heat shock factors and regulatory conditions. In: Stress-inducible Cellular Responses. Birkhäuser. pp 139-163.
- Nagasawa, T., Hatayama, T., Watanabe, Y., Tanaka, M., Niitsato, Y. e Kitts, D.D. (1997) Free radical-mediated effects on skeletal muscle protein in rats treated with Fe-nitrilotriacetate. *Bioch. Biophys. Res. Com.* **231**, 37-41.
- Nakamura, T., Masui, S., Wada, M., Katoh, H., Mikami, H. e Katsuta, S. (1993) Heredity of muscle fibre composition estimated from a selection experiment in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* **66**, 85-89.
- Naqui, A., Chance B. and Cadenas, E. (1986) Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* **55**:137.
- Neufer, P.D., Ordway, G.A., Hand, G.A., Hand, J.M., Shelton, J.A., Richardson, J.A., Benjamin, I.J. e Williams, R.S. (1996) Continuous contractile activity induces fiber type specific expression of HSP70 in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **271**, C1828-C1837.

- Neufer, P.D., Ordway, G.A. e Williams, S. (1998) Transient regulation of c-fos, alfaB-crystallin, and hsp70 in muscle during recovery from contractile activity. *Am. J. Physiol.* **274**, C341-C346.
- O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021.
- Pacifici, R.E., Kono, Y. e Davies, K.J.A. (1993) Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hidroxy radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteassome. *J. Biol. Chem.* **268**, 15405-15411.
- Patton, W. F. (1995) Biologist's prespective on analytical imaging systems as applied to protein gel electrophoresis. *J. Chromatography A* **698**, 55-87.
- Pette, D. e Vrbová, G. (1985) Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. *Muscle Nerve* **8**, 676-689.
- Pette, D. e Vrbová, G. (1992) Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmac.* **120**, 115-202.
- Polla, B.S., Kantengwa, S., François, D., Salvioli, S., Franceschi, C., Marsac, C. e Cossarizza, A. (1996) Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 6458-6463.
- Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L.L., Martin, D., Herb, R.A. e Dudley, G. (1994) Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **266**, R375-R380.
- Prince, F. P., Hikida, R. S. e Hagerman, F. C. (1976) Human muscle fiber types in power lifters, distance runners and untrained subjects. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* **363**, 19-26.
- Quiroga, G.B. (1992) Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress?. *Free Rad. Biol. Med.* **13**, 325-340.
- Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C. e Milligan, R. A. (1993) Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science Wash. DC* **261**, 58-65.
- Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schidt-Bäse, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M. M., Winkelman, D. A., Wesenberg, G. e Holden, H. M. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science Wash. DC* **261**, 50-58.
- Reid, M.B. (1996) Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. *News Physiol. Sci.* **11**, 114-119.
- Reisner, J., Moss, R. L., Giulian, G. C. e Greaser, M. L. (1985) Shortening velocity and myosin heavy chains in developing rabbit muscle fibres. *J. Biol. Chem.* **260**, 14403-14405.
- Reznick, A.Z., Witt, E., Matsumoto, M. e Packer, L. (1992) Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercise rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 801-806.
- Riabowol, K. T., Mizzen, L. A. e Welch, W. J. (1988) Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science Wash. DC* **242**, 433-436.

- Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia Basel* **18**, 571-573.
- Ryter, S.W., Pacifici, R.E., and Davies, K.J.A. (1990) Constitutive and inducible repair systems in oxidative stress. In: *Biological Oxidation Systems*, pp. 929-952. New York: Academic Press.
- Salo, D. C., Donovan, C. M. e Davies, K. J. (1991) HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart and liver during exercise. *Free Radical Biol. Med.* **11**, 239-246.
- Sanchez, Y. e Lindquist, S. (1990) Hsp104 required for induced thermotolerance. *Science*, **248**, 1112-1115.
- Sanchez, Y., Parsell, D. A., Toulieu, J., Vogel, J. C., Craig, E. A. e Lindquist, S. (1993) Genetic evidence for a functional relationship between hsp104 and hsp70. *J. Bacteriol.*
- Schiaffino, S. e Reggiani, C. (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **77**(2), 493-501.
- Sen, C. (1995) Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl. Physiol.* **79**(3), 675-686.
- Siow, R. C. M., Ishii, T., Sato, H., Taketani, S., Laeke, D. S., Sweiry, J. H., Pearson, J. D., Bannai, S., Mann, G. E. (1995) Induction of the antioxidant stress proteins heme oxygenase-1 and MSP23 by stress agents and oxidised LDL in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* **368**, 239-242.
- Sjodin, B., Wesling, H. e Apple, S. (1990) Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* **10**, 236-254.
- Skidmore, R., Gutierrez, J.A., Guerriero, J.V. e Kregel, K.C. (1995) HSP70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. *Am. J. Physiol.* **268**, R92-R97.
- Skowyra, D., Geogopoulos, C., and Zylicz, M. (1990) The *E. coli* dnaK gene product, the HSP70 homologue, can reactivate heat inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis dependent manner. *Cell* **62**, 939-944.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. e Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem* **150**, 76-85.
- Snoj-Cvetko, E., Sketelj, J., Dlene, I., Obreza, S., Janmot, C., d'Albis, A. e Erzen, I. (1996) Regenerated rat fast muscle transplanted to the slow muscle bed and innervated by the slow nerve, exhibits an identical myosin heavy chain repertoire to that of the slow muscle. *Histochem. Cell. Biol.* **106**, 473-479.
- Stadtman, E.R. (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad. Biol. Med.* **9**, 315-325.
- Stadtman, E.R. (1992) Protein oxidation and aging. *Science* **257**, 1220-1224.
- Stainsby, W.N. e Brooks, G.A. (1990) Control of lactic acid metabolism in contracting muscles and during exercise. *Exerc. Sport Sci. Ver.* **18**, 29-63.

- Staron, R. S. e Johnson, P. (1993) Myosin polymorphism and differential expression in adult human skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* **106B**, 463-475.
- Storz, G. e Polla, B.S. (1996) Transcriptional regulators of oxidative stress-inducible genes in prokaryotes and eukaryotes. In: *Stress-inducible Cellular Responses*. Birkhäuser. pp 239-254.
- SWISS PROT: Annotated protein sequence database <http://www.expasy.ch/sprot/>
- SWISS 2D-PAGE: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database <http://www.expasy.ch/ch2d/>
- Talmadge, R.J. e Roy, R.R. (1993) Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J. Appl. Physiol.* **75**(5), 2337-2340.
- Termin, A. e Pette, D. (1992) Changes in myosin heavy-chain isoform synthesis of chronically stimulated rat fast-twitch muscle. *Eur. J. Biochem.* **204**, 569-573.
- Toda, T. e Ohashi, H. (1995) Current status and perspectives of computer aided two-dimensional densitometry. *J. Chromatography A* **698**, 41-54.
- Towbin, H. e Gordon, J. (1984) Immunoblotting and dot immunobinding - current status and outlook. *J. Immunological methods* **72**, 313-317.
- Trybus, K. M. (1994) Role of myosin light chains. *J. Muscl. Research and Cell Motility* **15**, 587-594.
- Turrens, J.F., Thornton, J., Barnard, M.L., Snyder, S., Liu, G. e Downey, J.M. (1992) Protection from reperfusion injury by preconditioning hearts does not involve increased antioxidant defenses. *Am. J. Physiol.* **262**, H585-H589.
- Venditti, P. e Meo, S.D. (1996) Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch. Bioch. Biophys.* **331**, 63-68.
- Vile, G.F., Basu-Modak, S., Waltner, C. e Tyrell, R.M. (1994) Heme oxygenase-1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2607-2601.
- Voellmy, R. (1996) Sensing stress and responding to stress. In: *Stress-inducible Cellular Responses*. Birkhäuser. pp 121-137.
- Weintraub, H., Tapscot, S. J., Davis, R. L., Thayer, M. J., Adam, M. A., Lassar, A. B. e Miller, D. (1989) Activation of muscle specific genes in nerve, fat, liver and fibroblast cell line by forced expression of MyoD. *Proc. National Acad. Science* **86**, 5434-5438.
- Welch, W. J. e Feramisco (1984) Nuclear and nucleolar localization of the 72000 dalton heat-shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **259**, 4501-4513.
- Welch, W. J. (1992) Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* **72**, 1063-1081.
- Welch, W. J. (1993) How cells respond to stress. *Scientific American* **268** (5), 34-41.

Weydert, A., Barton, P., Harris, A. J., Pinset, C. e Buckingham, M. (1987) Developmental pattern of mouse skeletal myosin heavy chain gene transcripts in vivo and in vitro. *Cell* **49**, 121-129.

Witzmann, F., Clark, J., Fultz, C. e Jarrot, B. (1995) Two-dimensional electrophoretic mapping of hepatic and renal stress proteins. *Electrophoresis* **16**, 451-559.