



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**A Expressão e a Atividade da Bomba MRP1/GS-X e de Proteínas de Choque
Térmico (HSP70) no Miocárdio e Gastrocnêmio de Ratos Adaptados a Uma
Semana de Natação: Possível Mecanismo de Citoproteção Induzido pelo
Exercício
Contra os Efeitos do Estresse Oxidativo**

Dissertação de Mestrado

Mauricio da Silva Krause

Porto Alegre, 2005

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

A Expressão e a Atividade da Bomba MRP1/GS-X e de Proteínas de Choque Térmico (HSP70) no Miocárdio e Gastrocnêmio de Ratos Adaptados a Uma Semana de Natação: Possível Mecanismo de Citoproteção Induzido pelo Exercício Contra os Efeitos do Estresse Oxidativo

Mauricio da Silva Krause

Orientador: Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior

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

Porto Alegre, 2005

**A Expressão e a Atividade da Bomba MRP1/GS-X e de Proteínas de Choque
Térmico (HSP70) no Miocárdio e Gastrocnêmio de Ratos Adaptados a Uma
Semana de Natação: Possível Mecanismo de Citoproteção Induzido pelo
Exercício
Contra os Efeitos do Estresse Oxidativo**

Mauricio da Silva Krause

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

Orientador: _____

Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior

Comissão Examinadora: _____

Profa. Dra. Tânia Cristina Pithon Curi (USP/Unimep/Unicastelo)

Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen (Fisiologia-UFRGS)

Profa. Dr. Álvaro Reischak de Oliveira (ESEF-UFRGS)

“Com efeito, é possível que nenhum de nós saiba nada de importante; só que ele pensa que sabe, embora não saiba; ao passo que eu, se nada sei, também não considero que sei. Em suma, parece-me que sou um pouco mais sábio do que ele, quanto mais não seja pelo fato de não considerar saber aquilo que não sei”.

Sócrates

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela formação do meu caráter, amizade, amor e apoio incondicional, sem o qual não teria sido possível a realização dos meus projetos de vida.

A minha namorada, Josianne, pela paciência em tolerar minhas obsessões profissionais, amor e companheirismo.

Aos meus irmãos pelos momentos de alegria e bom humor.

Ao meu orientador e amigo Paulo Ivo, pela oportunidade, atenção, apoio e confiança, bem como pelas calorosas discussões sobre fisiologia e bioquímica.

Aos meus colegas de laboratório, dos quais sempre pude contar com a boa vontade e paciência. Pelas eternas, mas sempre divertidas, madrugadas no laboratório de fisiologia celular.

Aos professores e funcionários do departamento de fisiologia e ao pessoal da segurança do ICBS.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste projeto.

Aos colegas de pós-graduação pelas prazerosas horas de estudos e discussões.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
1.1Objetivos.....	15
1.2 Objetivo Principal.....	15
1.3 Objetivos Específicos.....	16
1.4 Estratégia Experimental.....	16
1.5 Justificativa e Impacto Social	16
REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Estresse, proteínas de choque térmico e citoproteção.....	18
2.2 Heat shock factors e a regulação da resposta do choque térmico.....	21
2.3 Papel citoprotetor das HSP.....	24
2.4 Outras Chaperonas.....	25
2.4.1 Pequenas.....	25
2.4.2 HSP60.....	26
2.4.3 HSP90.....	27
2.5 Radicais Livres, estresse oxidativo e exercício.....	27
2.6 NO, HSP e proteção contra injúria tecidual.....	34

2.7 HSP e Citoproteção no Miocárdio.....	38
2.8 Regulação da expressão de HSP70 no miocárdio durante o exercício.....	40
2.9 Músculo esquelético, exercício e expressão de HSP.....	46
2.10 Músculo esquelético, treinamento físico e expressão de HSP.....	52
2.11 Bomba GS-X.....	53
2.12 Metabolismo da Glutathione e a Bomba GS-X.....	54
2.13 Proteínas Multidroga resistentes.....	58
2.14 A Famílias das MRP`s.....	60
2.15 Substratos e Propriedades Cinéticas.....	64
2.16 Liberação de Glutathione por diferentes isoformas de MRP.....	65
2.17 Função da MRP na defesa contra o Estresse Oxidativo.....	66
2.18 Regulação dos Genes da MRP.....	67
METODOLOGIA.....	70
3.1 Animais.....	70
3.2 Exercício.....	70
3.3 Treinamento.....	71
3.4 Grupos experimentais.....	71
3.5 Preparações e determinações bioquímicas realizadas.....	71
3.6 Determinação do conteúdo intracelular de GSH (glutathione reduzida) e GSSG (dissulfeto de glutathione ou glutathione oxidada).....	72
3.7 Expressão de proteínas de choque térmico (HSP) e análises por SDS-PAGE....	75
3.8 Expressão de MRP1 e análises por SDS-PAGE.....	77
3.9 Cálculo das concentrações de proteínas nas amostras analisadas.....	78

3.10 Medida da atividade da ATPase de GSH (Bomba GS-X) em membranas de músculo cardíaco e gastrocnêmio.....	79
3.11 Análise estatística.....	84
4. RESULTADOS.....	85
4.1 Metabolismo da glutatona no miocárdio de ratos submetidos ao exercício agudo de natação.....	85
4.2 Metabolismo da glutatona no miocárdio de ratos submetidos ao exercício agudo após treinamento de natação.....	89
4.3 Variações no metabolismo da glutatona no miocárdio entre animais submetidos ao exercício agudo e treinados por uma semana.....	93
4.4 Metabolismo da glutatona no gastrocnêmio de ratos submetidos ao exercício agudo de natação.....	97
4.5 Metabolismo da glutatona no gastrocnêmio de ratos submetidos ao exercício agudo após treinamento de natação.....	101
4.6 Variações no metabolismo da glutatona no gastrocnêmio entre animais submetidos ao exercício agudo e treinados por uma semana.....	105
4.7 Atividade da Bomba MRP1/GS-X no gastrocnêmio e miocárdio de ratos treinados submetidos a exercício agudo de natação.....	109
4.8 Expressão de Proteínas de Choque Térmico (HSP70) e da bomba MRP1/GS-X no miocárdio e gastrocnêmio de ratos sedentários e treinados submetidos a exercício físico agudo	112
6. DISCUSSÃO.....	120
5. CONCLUSÕES.....	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Revisão dos nomes alternativos para a família das MRP's.....	57
Figura 2. Modelo topológico da estrutura da MRP1 e 5.....	60
Figura 3. MRP1 e 2 mediando o transporte de GSSG.....	65
Figura 4. Conteúdo de dissulfeto de glutaciona no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo de natação.....	84
Figura 5. Conteúdo de glutaciona reduzida no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo de natação.....	85
Figura 6. Relação média de GSSG/GSH no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo de natação.....	86
Figura 7. Conteúdo de dissulfeto de glutaciona no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo de natação após treinamento.....	88
Figura 8. Conteúdo de glutaciona reduzida no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo de natação após treinamento.....	89
Figura 9. Relação média de GSSG/GSH no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo de natação após treinamento.....	90
Figura 10. Conteúdo médio de glutaciona reduzida no miocárdio. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média.	92
Figura 11. Conteúdo médio de dissulfeto de glutaciona no miocárdio. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média.	93
Figura 12. Relação média de GSSG/GSH no miocárdio. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média.....	94
Figura 13. Conteúdo médio de GSSG no gastrocnêmio de ratos submetidos a exercício agudo de natação.	96
Figura 14. Conteúdo médio de glutaciona reduzida no gastrocnêmio de animais sedentários submetidos ao exercício agudo de natação.....	97
Figura 15. Relação GSSG/GSH média no gastrocnêmio de ratos submetidos ao exercício agudo de natação.....	98
Figura 16. Conteúdo médio de glutaciona reduzida no gastrocnêmio de animais treinados submetidos ao exercício agudo de natação.....	100
Figura 17. Conteúdo médio de glutaciona oxidada no gastrocnêmio de animais treinados submetidos ao exercício agudo de natação.....	101
Figura 18. . Relação GSSG/GSH média no gastrocnêmio de ratos treinados submetidos ao exercício agudo de natação.....	102
Figura 19. Conteúdo médio de dissulfeto de glutaciona no gastrocnêmio.....	104
Figura 20. Conteúdo médio de glutaciona reduzida no gastrocnêmio.....	105
Figura 21. Relação média de GSSG/GSH no gastrocnêmio.....	106
Figura 22. Atividade GS-X no miocárdio de ratos treinados.....	108
Figura 23. Atividade GS-X no gastrocnêmio de ratos treinados.....	109
Figura 24. Expressão de HSP70 em animais sedentários submetidos ao exercício físico e seus respectivos controles.....	111
Figura 25. Expressão de HSP70 e MRP1 em ratos treinados.....	112
Figura 26. Expressão média de HSP70 no miocárdio de ratos.....	114
Tabela 27. Expressão de MRP1 em miocárdio de ratos.....	115
Figura 28. Expressão de HSP70 em gastrocnêmio de ratos treinados.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isoformas de MRP. Atividade GS-X, transportadora de drogas e localização no corpo.....	62
Tabela 2. Metabolismo da Glutathione no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo.	83
Tabela 3. Metabolismo da Glutathione no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo após treinamento de natação.	87
Tabela 4. Metabolismo da Glutathione no gastrocnêmio de ratos submetidos a exercício físico agudo.....	95
Tabela 5. Metabolismo da Glutathione no gastrocnêmio de ratos submetidos a exercício físico agudo após treinamento de natação.....	99
Tabela 6. Atividade da bomba MRP1/GS-X no gastrocnêmio e miocárdio de ratos treinados submetidos a exercício agudo de natação.....	107
Tabela 7. Expressão de HSP70 e MRP1 no miocárdio e gastrocnêmio de ratos treinados.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS

ROS- Espécies reativas do oxigênio

GPx- Glutathione peroxidase

GSH- Glutathione Reduzida

GSSG- Dissulfeto de Glutathione

GST- Glutathione S-transferase

HSP – Heat shock protein (proteína de choque térmico)

LPO- Lipoperoxidação

MRP – Multi drug resistance protein (Proteína de multirresistência a drogas)

NO- Óxido nítrico

PMSF – Fluoreto de fenil metil sulfonila

QI- Quimiluminescência

SOD – Superóxido Dismutase

TBA-RS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

RNS- Espécies reativas do nitrogênio

ROI – Intermediários reativos do oxigênio

RESUMO

A relação entre as concentrações intracelulares de glutatona (GSH) e dissulfeto de glutatona (GSSG), dita o estado redox celular que, por sua vez, modula a atividade de muitos genes e proteínas sensíveis às alterações de potencial redox. As proteínas de choque térmico (HSP) são fundamentais na defesa contra o estresse oxidativo e em processos de reparo celular. Já a bomba GS-X codificada pelo gene MRP1 pode regular o estado redox celular exportando dissulfeto de glutatona (GSSG), prevenindo o estresse oxidativo. Nosso objetivo foi verificar a expressão de HSP70, da bomba MRP1 e sua atividade, bem como o metabolismo da glutatona (GSH) no miocárdio e gastrocnêmio de ratos submetidos ao exercício agudo e ao treinamento físico de natação. Ratos machos Wistar, separados em controle e exercício (n=6; treinamento de uma semana, com carga de 5% do peso corporal na cauda, temperatura da água $\pm 30^{\circ}\text{C}$). Após o exercício os ratos foram sacrificados e o músculo cardíaco e gastrocnêmio retirados. Para análise do estado redox, foram utilizadas técnicas bioquímicas de análise do conteúdo intracelular de GSH e GSSG; para análise da expressão de HSP70 e MRP1 foram utilizadas técnicas de SDS-PAGE e Western blotting. A atividade da bomba MRP1 foi medida por técnicas espectrofotométricas em membranas isoladas dos músculos em estudo. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Foi utilizado o teste de análise de variância complementado com o teste de comparações múltiplas de Student-Newmann-Keus, para $p \leq 0,05$. Na análise do estado redox celular ($[\text{GSSG}]/[\text{GSH}]$), o miocárdio não apresentou mudanças significativas, enquanto que o gastrocnêmio do grupo exercício demonstrou aumento nesta modalidade indicando estresse (controle: $0,424 \pm 0,056$ e exercício: $3,775 \pm 0,466$). Com relação à expressão de HSP70 (unidades arbitrárias), o miocárdio não apresentou diferença, enquanto o gastrocnêmio do grupo exercício obteve um aumento significativo (controle $0,602 \pm 0,047$ e exercício $0,807 \pm 0,224$). Na expressão da MRP1, o coração apresentou diferença significativa (controle: $0,360 \pm 0,028$ e exercício: $0,800 \pm 0,094$), enquanto o gastrocnêmio não. A atividade da bomba MRP1 foi 21,4% maior no coração, e essa atividade foi diminuída pelo treinamento em 27,76% em relação ao controle. Os dados obtidos indicam que o miocárdio parece estar mais protegido do que o gastrocnêmio contra o estresse oxidativo induzido pelo exercício por apresentar maior expressão e atividade da bomba MRP1, uma vez que esta previne o acúmulo de GSSG intracelular bombeando o mesmo para o exterior da célula.

ABSTRACT

The relation enters the intracellular concentrations of glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG), said the cellular redox state that, in turn, it modulates the activity of many genes and sensible proteins to the potential alterations redox. The HSPs is basic in the defense against oxidative stress and in processes of cellular repair. Already the MRP1 can regulate the cellular state redox exporting glutathione disulfide (GSSG), preventing oxidative stress. Our objective was to verify the expression of HSP70, MRP1 pump and its activity, as well as the metabolism of glutathione (GSH) in the myocardium and gastrocnemium of rats submitted to the acute exercise and the physical training of swimming. Male rats (Wistar), separate in control and exercise (n=6; training of one week, with load of 5% of the corporal weight in the tail, temperature water $\pm 30^{\circ}\text{C}$). After the exercise the removed rats had been sacrificed and cardiac muscle and gastrocnemium muscle. For analysis of the redox state, had been used biochemical techniques of analysis of the intracellular content of GSH and GSSG; for analysis of the expression of HSP70 and MRP1 techniques of SDS-PAGE and Western blotting had been used. The activity of MRP1 pump was measured by spectrophotometric techniques. The results had been express as average \pm shunting line standard of the average. The test of analysis of variance was used complemented with the test of multiple comparisons of Student-Newmann-Keus. In the analysis of the cellular redox state ($[\text{GSSG}]/[\text{GSH}]$), the myocardium did not present significant changes, while that the gastrocnemium of the group exercise demonstrated increase in this modality indicating stress (control: $0,424 \pm 0,056$ and exercise: $3,775 \pm 0,466$). With relation to the HSP70 expression (Unit. arbit.), the myocardium did not present difference, while the gastrocnemium of the exercise group got a significant increase ($0,047$ control $0,602 \pm$ and $0,807$ exercise $\pm 0,224$). In the expression of the MRP1, the heart control presented significant difference ($0,360 \pm 0,028$ and exercise: $0,800 \pm 0,094$), while the gastrocnemio not. The activity of MRP1 pump was 21.4% greater in the heart, and this activity was diminished by the training in 27,76% in relation to the control. The gotten data indicate that the myocardium seems to be more protecting than gastrocnemio against oxidative stress induced for the exercise for presenting greater expression and activity of bomb MRP1, a time that this prevents the intracellular accumulation of GSSG the same pumping for the exterior of the cell.

1. INTRODUÇÃO

O termo proteína de choque térmico (HSP, do Inglês, *heat shock protein*) tem sido usado para um grupo de proteínas de expressão induzida por calor ou por outros desafios metabólicos. A indução dessas proteínas é fundamental nos processos de reparo que seguem diferentes tipos de danos e na prevenção da agregação de proteínas não nativas, principal mecanismo através do qual as HSP conferem citoproteção. A exposição prévia das células a condições estressantes, não-letais, pode suscitar a síntese de HSP e proteger contra os efeitos lesivos de novas exposições. Uma vez que o exercício físico é capaz de proporcionar condições bastante semelhantes àquelas indutoras da síntese de HSP, é provável que a expressão de HSP esteja relacionada com a prevenção de desnaturação protéica por radicais livres, sendo qual se constitui em uma e das principais alterações moleculares que levam a cardioproteção induzida pelo exercício.

O estresse oxidativo induzido por situações estressantes, como por exemplo, de isquemia-reperfusão, levam ao aumento do conteúdo intracelular de glutathiona oxidada (GSSG) e a depleção de glutathiona reduzida (GSH), alterando o estado redox e logo a homeostase celular. Sabe-se que o aumento de GSSG e depleção de GSH afetam a função de inúmeras proteínas por um processo conhecido como glutatiolação (formação de pontes dissulfeto mistas), como, por exemplo, à bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA) inativando-a e, com isso, aumentando o conteúdo intracelular de cálcio, podendo ser então maléfica para a função cardíaca.

A bomba MRP1/GS-X (multidrug resistance protein 1), encontrada em diversas células, inclusive no miocárdio e músculo esquelético, tem a capacidade de bombear o conteúdo de glutatona oxidada para o meio extracelular, impedindo seu acúmulo e com isso a manutenção do estado redox celular e com isso pode estar envolvida no processo de cardioproteção.

Por estas razões, foi proposta a investigação do comportamento destas variáveis (HSP70, MRP1 e metabolismo da glutatona) no miocárdio e músculo esquelético de ratos em uma situação estressante de exercício físico agudo.

1.1 OBJETIVOS

Conforme discutido acima, HSP são induzidas pelo exercício e fazem citoproteção. Entretanto o mecanismo de indução pelo exercício não está esclarecido. Alterações de expressão e atividade da bomba MRP1 nunca foram investigadas em exercício tampouco sua relação com a cardioproteção. Por esta razão, neste trabalho propusemos investigar os aspectos da indução de HSP70 e MRP1 relacionada ao exercício físico no miocárdio.

1.2 Objetivo principal

Caracterizar a correlação entre a indução da síntese de HSP e MRP1 no músculo cardíaco e estresse oxidativo; sua comparação com o músculo esquelético em resposta ao exercício agudo e treinamento e seu significado fisiológico.

1.3 Objetivos específicos:

- Avaliar a existência de expressão de HSP70, em resposta às alterações cardiovasculares induzidas pelo exercício agudo e ao treinamento físico.
- Avaliar a expressão e atividade da bomba MRP1/GS-x em resposta às alterações cardiovasculares induzidas pelo exercício agudo e ao treinamento físico.
- Avaliar o estado redox através do metabolismo da glutathiona.
- Comparar as alterações destas variáveis no músculo cardíaco e no gastrocnêmio.

1.4 Estratégia Experimental:

Avaliar em ratos sedentários (controles) e treinados (em natação) no miocárdio e gastrocnêmio:

- Expressão de HSP70;
- Expressão e atividade da bomba MRP1/GS-X;
- Determinação das concentrações intramusculares de GSH (glutathiona reduzida), GSSG (dissulfeto de glutathiona ou glutathiona oxidada) - (relação GSSG/GSH, índice de estresse oxidativo).

1.5 JUSTIFICATIVA E IMPACTO SOCIAL

O exercício físico também é capaz de promover a síntese de proteínas de estresse. Entretanto, o mecanismo exato de indução de HSP e seu papel na resposta

à injúria resultante do exercício ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que a HSP70 é uma provável candidata à cardioproteção induzida pelo exercício, enquanto a MRP1, que jamais foi relacionada a esta função, pode ser uma das proteínas mais importante em situações de estresse cardiovascular.

Como foi discutido anteriormente, o acúmulo de GSSG no interior da célula, está diretamente relacionado com a perda da função de diversas proteínas essenciais para a homeostase cardíaca. Por esta razão, qualquer fator que altere o conteúdo de GSSG para menos, pode ser um mecanismo de cardioproteção.

Dado que a prática de atividades físicas é um fenômeno social indiscutível e contribui para a promoção da qualidade de vida, a pesquisa e produção científica e/ou acadêmica mostra-se plenamente justificável. Por isso, a relevância social do projeto é óbvia, uma vez que o mesmo virá a contribuir para produção de conhecimento na área de Fisiologia Humana e do Exercício. Além disso, a geração desse conhecimento permitirá que o acompanhamento das adaptações orgânicas às atividades físicas direcionadas ao tratamento de doenças crônico-degenerativas seja feito de forma mais eficiente e racional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estresse, proteínas de choque térmico e citoproteção

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

A natureza universal dessa resposta tem sido continuamente confirmada desde sua descrição inicial por Ritosa em (1962), em células de glândula salivar de *Drosophila busckii*. Segundo este autor, a sujeição das larvas deste inseto a um choque térmico¹, por 30 min, determinava uma alteração do padrão de espessamento cromossomal². Como esses espessamentos são locais de intensa atividade transcricional, a mudança de padrão evidenciava que o choque térmico havia ativado um conjunto de genes que determinavam a expressão de um grupo específico de proteínas. Ritosa também demonstrou que a variação no padrão de espessamento cromossomal ocorria quando a temperatura atingia rapidamente um valor limiar

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

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

determinado, e não em resposta a qualquer variação brusca de temperatura de amplitude entre 5 a 6 °C (RITOSA, 1962).

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

A importância das HSP para a manutenção da homeostase celular pode ser avaliada pelo fato de estas proteínas constituírem uma classe altamente conservada, desde procariotos até o homem (MEYER e DA SILVA, 1999). Elas podem ser agrupadas por suas massas moleculares, em famílias, sendo as mais comuns: HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e HSP30 (27,28 e 30 e p³²-heme-oxigenase). Muitas destas famílias de proteínas têm sido identificadas em células de mamíferos (FEHRENBACH and NIESS, 1999), sendo que o principal grupo de HSP apresenta peso molecular de aproximadamente 70 kDa e ponto isoelétrico entre os pH 5,2 e 6,3 (LOCKE, NOBLE and ATKINSON, 1991). Incluído neste grupo estão as

³ heat shock/stress proteins

⁴ stress proteins

⁵ proteína que funciona como canal iônico

proteínas conhecidas como reguladas pela glicose (GRP⁶) (LOCKE, NOBLE and ATKINSON, 1991) que são induzidas por privação de glicose, influxo de cálcio, exposição prolongada a hipóxia ou agentes que perturbam a N-glicosilação (FEHRENBACH and NIESS, 1999).

As HSP não são induzidas apenas em condições de estresse. Há componentes desta classe de proteínas que são expressos constitutivamente (HSC⁷), ou seja, em células não submetidas a condições de estresse. As formas induzíveis, quando expressas, se somam às constitutivas (MEYER e DA SILVA, 1999). Em células eucarióticas, a família das proteínas de 70 kDa é composta primariamente pela HSP70, que é uma proteína induzível de 72 kDa e da HSC70 que é uma proteína constitutiva de 73 kDa. Os membros desta família possuem um domínio capaz de ligar ATP e outro de ligar peptídeos, e se localizam tanto no compartimento nuclear, como no citoplasmático (WELCH, 1992). Quando estas proteínas atacam uma proteína desnaturada (dobrada de forma inadequada⁸) ou nascente (ainda não dobrada⁹), estabelecem com estas uma ligação através do domínio ligante de peptídeo com o objetivo de impedir agregação proteína-proteína. Como documentado para a RNA-polimerase, a HSP70 desagrega e reativa as proteínas termicamente danificadas. A energia liberada pela hidrólise do ATP é utilizada para separar a proteína da HSP. A família HSP70 também auxilia no correto dobramento e estabilização de polipeptídeos recém-formados, antes de estes assumirem seus estados nativos. Em função destas características, as HSP70 são conhecidas como

⁶ glucose regulated proteins.

⁷ Heat Shock Cognates

⁸ misfolded

chaperonas moleculares¹⁰ (WELCH, 1992; ESSIG and NOSEK,1997). As HSC70 são encontradas em níveis relativamente altos na maioria das células. Em presença de estresse e da desnaturação de proteínas, as HSC70 migram para o núcleo e nucléolo, onde ligam a pré-ribossomas desnaturados ou que ainda não tenham adquirido a conformação nativa. Acredita-se que HSC70 e HSP70 auxiliem na estabilização de proteínas, sendo que a primeira agiria regularmente, em condições não-estressantes, enquanto a segunda seria sintetizada para atender demandas extras impostas à célula sob estresse (ESSIG and NOSEK,1997).

2.2 Heat shock factors e a regulação da resposta ao choque térmico.

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

⁹ unfolded

¹⁰ do Inglês, *chaperone* = acompanhante

(AMIN et al. 1988). Em mamíferos, nos promotores dos genes das HSP70 e HSP90, o HSE é composto por cinco e seis unidades pentaméricas, respectivamente, em estreita proximidade com os elementos basais dos promotores (SANTORO, 2000). Enquanto um único tipo de HSF foi descrito em fungos e em *Drosophila*, uma família multigênica de HSF foi identificada em plantas e vertebrados. A presença de diferentes HSFs na maioria dos eucariotos sugere que a interação entre eles deva ser importante para proteger organismos complexos das diversas formas de alterações ambientais (SANTORO, 2000).

Em um grande número de eucariotos, o HSF1 está presente tanto em células submetidas, como não submetidas a diferentes tipos de estresse. Entretanto, na ausência de estresse, o HSF1 é expresso na forma de um monômero inerte ligado à HSP70 e a outras chaperonas. Na presença de um agente estressante capaz de provocar um súbito aumento na presença de proteínas não-nativas, se estabelece maior necessidade de chaperonas (HSP70, HSP90) para prevenir o surgimento de agregados de proteínas desnaturadas. Conseqüentemente, as chaperonas dissociam-se dos monômeros de HSF1, permitindo que estes assumam um estado trimérico, sejam fosforilados nos resíduos de serina e translocados para o núcleo. A partir deste momento, ligam-se aos HSEs, localizados a montante dos genes HSP, resultando na transcrição induzida por estresse. Com o aumento da síntese de HSP, é restabelecido equilíbrio inicial entre chaperonas livres e ligadas à proteínas não-nativas. As HSP deslocam-se para o núcleo, ligam-se ao domínio ativador de transcrição dos HSF1, reprimindo novamente o processo de transcrição de genes HSP (SANTORO, 2000, FEHRENBACH and NIESS, 1999).

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

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

Embora a expressão de HSP seja regulada primariamente em nível transcricional, mecanismos pós-transcricionais também devem ser importantes. O mRNA de HSP70 é relativamente instável sob condições fisiológicas normais e é quase indetectável através de Northern blot em músculos não submetidos a estresse. Assim, quando o status fisiológico volta ao normal, a quantidade de mRNA de HSP70 viável é diminuída, determinando baixos níveis de transcrição (FEHRENBACH and NIESS, 1999).

2.3 Papel citoprotetor das HSP

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

O papel citoprotetor das HSP e, em particular, das HSP70, tem sido extensivamente documentado tanto *in vitro* como *in vivo*, em uma variedade de doenças humanas incluindo: distúrbios metabólicos, inflamação, infecção e isquemia. No tecido cardíaco, diferentes tipos de agressões, incluindo isquemia miocárdica, trauma e hipertermia, resultam na síntese de HSP, as quais desempenham um papel central no restabelecimento da função cardíaca após injúria, tanto *in vitro* como em modelos animais. No caso da inflamação, as HSP protegem as células de mamíferos da citotoxicidade mediada pelos TNF¹¹ α e β . Também foi demonstrado que a

expressão destas suprime a expressão de iNOS¹² (geradora de NO, um gás pró-inflamatório) em células da astroglia. Em modelos da síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA) em roedores, o acúmulo induzido de HSP70 nos pulmões está associado com uma diminuição da resposta inflamatória e prevenção da letalidade desta doença. A expressão aumentada de HSP também está associada com a inibição da replicação viral durante infecções agudas (SANTORO, 2000).

2.4 Outras Chaperonas

2.4.1 HSPs Pequenas

A ubiquitina provavelmente é a menor HSP (peso molecular de aproximadamente 8kDa) sendo expressa em praticamente todas as células dos mamíferos. É uma proteína altamente conservada que apresenta função na estrutura da cromatina bem como na degradação de proteínas. Muitas proteínas intracelulares são, antes de serem degradadas, ligadas covalentemente (em resíduos de lisina) e modificadas pela adição de ubiquitina. O aumento de ubiquitina após o estresse presumivelmente, facilita o endereçamento e remoção de proteínas desnaturadas como consequência do evento estressante.

A HSP20 foi encontrada em tecido muscular esquelético de ratos constituindo mais de 1,3% da proteína celular total do músculo e sua expressão é relacionada com a contração muscular, especialmente em fibras de contração lenta.

Tem sido demonstrado, que a HSP27 é expressa tanto em tecido muscular humano quanto de ratos. Ela se localiza no citossol em condições normais e é

translocada ao núcleo em condições de estresse. Esta proteína é expressa em concentrações relativamente baixas, porém em adição do estresse ela exibe uma indução de sua expressão de 10 a 20 vezes maior que em repouso. As principais funções relacionadas às HSP27 incluem a estabilização de microfilamentos e a transdução de sinal das citocinas.

Outra importante HSP encontrada nos músculos estriados é a alfa-cristalina. Esta se divide em duas isoformas: alfa A e alfa B. A primeira é expressa principalmente no cristalino enquanto a segunda é expressa constitutivamente em muitos tecidos diferentes e pode ser induzida pelo estresse fisiológico. Ambas dividem o mesmo gene de origem; o tipo B atua como chaperona molecular tanto para prevenir agregação de proteínas desnaturadas como para facilitar a renaturação da mesma. Por esta razão, o tipo B pode desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento das células musculares.

2.4.2 HSP60

O músculo esquelético é capaz de expressar HSP60 sob condições de estresse. Esta chaperona é encontrada no interior da mitocôndria, porém existem evidências de que ela é sintetizada no citoplasma e então translocada à mitocôndria onde é processada na sua forma madura. A HSP60 facilita o dobramento correto e a montagem de proteínas endereçadas a entrar na mitocôndria. Também é capaz de estabilizar proteínas sob situações de estresse. Essa proteína é expressa constitutivamente em tecido muscular estriado e outras células em proporção ao conteúdo mitocôndrial e é aumentada após estimulação elétrica crônica. Recentemente tem se demonstrado que o treinamento de resistência aumenta sua

expressão de forma correspondente com a atividade enzimática mitocondrial apresentada.

2.4.3 HSP90

As HSP90, são uma família de proteínas compostas por três subtipos: duas intimamente relacionadas com isoformas citoplasmáticas (α e β) e uma proteína reguladora da glicose (GRP94). A HSP90 é encontrada no citosol, núcleo e retículo endoplasmático, e é relatada existindo em muitos tipos de células. Outra importante atividade da HSP90 é a sua ligação com receptores de hormônios esteroidais não ligados, incluindo receptores de estrógeno, progesterona, glicocorticóides e andrógenos. A HSP90 apresenta um importante papel na regulação da atividade destes receptores onde, na ausência do hormônio, ela se fixa e os inativa; após a ligação do hormônio, ela se desliga dos receptores e permite que este seja translocado ao sítio específico no DNA.

2.5 Radicais livres, estresse oxidativo e exercício

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

KLAWITTER, 1999), assim como neutrófilos, eosinófilos e monócitos, em resposta ao exercício vigoroso (NIESS et al. 1999).

Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e, em função disso, apresentam acentuada reatividade química. Esta característica dá origem ao potente efeito oxidante desses radicais (que facilmente subtraem elétrons de substâncias aceptoras), que é a base para seu efeito destrutivo contra lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e a matriz extracelular. Os radicais livres de maior importância biológica são os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}) e óxido nítrico (NO). Vários mecanismos enzimáticos envolvendo a catálise por cobre ou ferro, são responsáveis pela geração destes radicais nos sistemas biológicos. Derivados oxidantes secundários podem resultar da reação de um radical livre com outro, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o peroxinitrito ($ONOO^-$) e o ácido hipocloroso (HOCl). Eles também contribuem para o estresse oxidativo devido ao fato de apresentarem ainda maior toxicidade do que os radicais livres originais. Uma distinção terminológica é feita entre as espécies reativas do oxigênio (ROS¹³), que incluem os radicais de oxigênio ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet}) e seus derivados (H_2O_2 e o átomo de oxigênio), e as espécies reativas do nitrogênio (RNS¹⁴), tais como o NO e o $ONOO^-$ (NIESS et al., 1999).

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes, o que pode ser consequência de condições como: isquemia-reperfusão, hipóxia severa, estresse térmico severo, choque séptico e lesão induzida

¹³ Reactive Oxygen Species

¹⁴ Reactive Nitrogen Species

por distensão muscular. Essas condições podem levar a injúria e disfunção mecânica (CLANTON e KLAWITTER, 1999).

Diversos mecanismos são apontados como responsáveis pela produção de radicais livres durante a atividade física. No processo de fosforilação oxidativa mitocondrial, a enzima citocromo oxidase catalisa a redução do oxigênio molecular, o que corresponde a 90 a 98% do consumo de O_2 . O oxigênio restante (2 a 10%) sofre redução incompleta, um processo que conduz à geração de superóxido (O_2^-). Assim, a quantidade absoluta de O_2^- tende a aumentar como resultado do aumento do consumo de oxigênio pelo músculo em contração (NIESS, et al. 1999).

Outro importante mecanismo de geração de O_2^- é a atividade da xantina oxidase¹⁵, que catalisa a conversão da hipoxantina em xantina, e esta em ácido úrico. Esta enzima age normalmente como desidrogenase, utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) como acceptor de elétrons. Entretanto, condições de proteólise causada por distúrbios na homeostase do cálcio intracelular, estresse térmico e oxidação de grupos tióis determinam sua conversão para a forma oxidase, a qual forma O_2^- durante sua ação catalítica. Tanto em condições de isquemia-reperfusão, como de exercício de alta intensidade, ocorre acúmulo de adenosina monofosfato (AMP) como resultado da ação da adenilato quinase, a fim de compensar a ressíntese inadequada de adenosina trifosfato (ATP). A metabolização subsequente do AMP para inosina monofosfato (IMP) leva a um aumento dos níveis de hipoxantina, a qual é o principal substrato da xantina oxidase. Além disso, a perturbação da homeostase do cálcio celular permite a conversão da xantina

¹⁵ Enzima localizada predominantemente no endotélio vascular

desidrogenase para sua forma oxidase e, portanto, aumenta a quantidade de O_2^- produzido durante e após o exercício (NIESS, et al. 1999).

Finalmente, um mecanismo adicional de formação de ROS é a conversão de H_2O_2 para o radical muito mais agressivo OH^- , via reação de Fenton, na presença de ferro. A extensão da geração de OH^- depende principalmente da disponibilidade de ferro livre. O exercício exaustivo parece estar associado a uma liberação aumentada de ferro das hemo e mioglobinas, ou de seus produtos de degradação, como resultado de danos ao tecido muscular. O cobre, catalisador na reação Haber-Weiss, também pode contribuir para a formação aumentada de OH^- (NIESS et al, 1999).

Os radicais livres podem agir como sinalizadores em diversos tipos de células (JACKSON, 1999; CLANTON, ZUO e KLAWITTER, 1999) e o conhecimento dos mecanismos através dos quais eles influenciam a expressão gênica é de importância particular nos tecidos que, como o músculo esquelético, são sistematicamente expostos a uma quantidade variável de estresse oxidativo (JACKSON, 1999). Especula-se que os radicais livres, através da indução de fatores de transcrição sensíveis ao estado redox da célula, como o $NF-\kappa B$ e a $AP-1$ ¹⁶, tenham importante papel na efetivação das adaptações ao treinamento físico. Corrobora com esta idéia o fato de que a geração intracelular de ROS, por estímulos patogênicos ou inflamatórios, resulta na degradação da subunidade inibitória $I-\kappa B$ do $NF-\kappa B$, permitindo que este ligue às seqüências reguladoras da expressão de genes-alvo. No entanto, o papel, no exercício, da ativação do $NF-\kappa B$ e do $AP-1$, pelas ROS, é pouco conhecido (NIESS et al. 1999).

Antagonizando os efeitos das ROS, os sistemas de proteção antioxidantes do corpo, assim como os antioxidantes alimentares, modulam diversos processos de sinalização sensíveis ao estado redox da célula. Esses sistemas, que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD – que dismuta o O_2^- em H_2O_2), catalase (CAT- que transforma H_2O_2 em H_2O), glutathione peroxidase (GSPx- que reduz peróxidos orgânicos na presença de GSH), heme oxigenase-1 (HO-1) e outras proteínas de choque térmico (HSP), podem ser influenciados tanto pelo esforço físico agudo como pelo treinamento (NIESS et al. 1999).

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

A influência de exercícios agudos e crônicos sobre a atividade da SOD, CAT e GSPx foi investigada em vários tecidos. A SOD, uma metaloproteína localizada primariamente no citoplasma e mitocôndrias de células de mamíferos, catalisa a conversão (dismutação) de superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e

¹⁶ Activator protein-1= dímero de *fos+jun*

oxigênio. A CAT remove o H_2O_2 pela conversão deste em água e oxigênio. A GSPx é uma enzima que catalisa a redução de H_2O_2 e peróxidos de ácidos graxos em água e dissulfeto de glutathione (também conhecida como glutathione oxidada, GSSG), utilizando GSH como doador de elétrons. A GSSG é regenerada a GSH numa reação em que o NADPH é o agente redutor. Resumidamente, o exercício vigoroso agudo aumenta a atividade da SOD no músculo esquelético, coração, pulmão, fígado e células sanguíneas vermelhas. Embora tenham sido detectados efeitos estimulantes do exercício sobre a GSPx, a influência do exercício agudo sobre a esta enzima ainda é inconsistente. O treinamento físico, por sua vez, parece induzir a atividade da GSPx e da SOD, embora não tenham sido demonstrados efeitos deste tipo de intervenção, sobre a atividade da CAT. Em leucócitos humanos, até o presente, não há dados disponíveis sobre mudanças na atividade de SOD, CAT ou GSPx, relativas ao exercício (NIESS et al. 1999).

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

sugerindo um estado pró-oxidante mais baixo nas células, devido a adaptações ao treinamento físico (NIESS et al. 1999).

A HSP70 também parece proteger contra o estresse oxidativo. No entanto, apenas a geração intracelular, e não a exposição extracelular às ROS, aumentam as HSP70 citoplasmáticas. Com relação aos efeitos protetores da HO-1 e da HSP70, a expressão aumentada dessas proteínas de estresse deve ajudar a manter a viabilidade, função e capacidade proliferativa de células imuno-competentes, durante e após o exercício vigoroso (NIESS et al. 1999). Como a ativação de vias das HSP bloqueia a ativação do NF- κ B, é possível que a expressão de HSP esteja relacionada à modulação da atividade de citocinas inflamatórias.

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

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

2.6 NO, HSP e proteção contra injúria tecidual

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

Em mamíferos, como resultado de seus efeitos antimicrobianos, o NO e outros RNS estão envolvidos na defesa do organismo (“host defense”). A enzima responsável pela síntese de NO, nestas situações, é a NO sintase induzível (iNOS¹⁷), que é expressa em monócitos, macrófagos, linfócitos T, neutrófilos, eosinófilos e células mesangiais, do sistema imunológico humano. Níveis normais de NO também são necessários para vários outros mecanismos fisiológicos, incluindo as funções de sinalização, mas sua produção excessiva pode ter efeitos prejudiciais para as células. No metabolismo energético, os complexos efeitos do NO incluem a inibição da NADH-ubiquinona e da succinato-ubiquinona-oxirredutase, na cadeia respiratória mitocondrial, e da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, na glicólise (NIESS et al. 1999).

Uma ampla variedade de fatores, ativadores e inibidores, foram identificados como moduladores da expressão de iNOS, através dos quais, várias citocinas desempenham seu papel. A expressão de iNOS, *in vitro*, pode ser estimulada pela

combinação de IFN- γ , TNF- α e IL- β . IL-8 e IL-6 têm um efeito mais inibitório, o qual pode ser entendido como um importante mecanismo de feedback na regulação da iNOS (NIESS et al. 1999) e dos efeitos do NO.

A influência do exercício físico sobre a expressão de iNOS e produção de NO em células imunocompetentes ainda é pouco conhecido. Foi demonstrado que a corrida exaustiva em esteira em uma intensidade de 110% do limiar anaeróbio individual (IAT), em homens não-treinados, resultou em aumento na expressão de iNOS em neutrófilos e linfócitos, o qual persistiu por 48 h após o exercício. Uma expressão aumentada de iNOS também foi observada imediatamente após uma corrida de meia-maratona. Uma vez que o NO não foi determinado nesses estudos, não se sabe se a expressão aumentada de iNOS se traduz em um aumento relevante na geração de NO pelos leucócitos. Além disso, o exato mecanismo levando a um aumento na expressão de iNOS, em função do exercício, não está claro. Fatores que produzem uma liberação aumentada de citocinas, como IFN- γ , TNF- α ou IL-1 β , sob estresse físico, podem estar envolvidos na produção aumentada de NO (NIESS et al. 1999) e precisam, portanto, ser investigados.

Segundo Veseley et al. (1998), no tecido muscular esquelético, a HO-1 parece ser induzida apenas por exercício ou estimulação elétrica *in vivo*. Estes autores, estudando os efeitos da hemina e do nitroprussiato de sódio em células da linhagem de mioblastos esqueléticos de rato L6G8, observaram um aumento tempo e dose-dependente na atividade de HO-1. O efeito do nitroprussiato de sódio, por sua vez,

¹⁷ inducible NO-synthase

era reduzido pela co-incubação com hidróxi-cobalamina, sugerindo que o NO deve estar envolvido na ativação do gene que codifica para HO-1.

A adenosina e o óxido nítrico, substâncias vasoativas candidatas para a regulação local do fluxo de sangue no músculo esquelético, aumentam nas células musculares e no fluido intersticial durante o exercício. Além disso, as enzimas responsáveis pela formação destas duas substâncias, AMP 5'-nucleotidase e a NOS, também estão ativas durante a contração muscular. Evidências *in vivo*, como *in vitro*, sugerem que o aumento na concentração intersticial de adenosina, induzido por contração, resulta da síntese extracelular mediada pela AMP 5'-nucleotidase extracelular ligada à membrana. Ainda não está claro se a indução da formação de óxido nítrico no músculo se origina da NOS endotelial, localizada no endotélio microvascular, ou da NOS neuronal (nNOS) das células nervosas e fibras musculares. Evidências funcionais do papel da adenosina no controle do fluxo sangüíneo muscular se apóiam em estudos utilizando agonistas e antagonistas do receptor de adenosina, adenosina desaminase ou inibidores da captação de adenosina. A maioria destes estudos foi realizada em animais de laboratório e, ainda que estes resultados mostrem alguma discrepância, a maioria indica que a adenosina participa na regulação do fluxo sangüíneo muscular. Em humanos, ainda faltam evidências que confirmem este papel da adenosina. O papel do NO para a fisiologia do músculo esquelético tem sido estudado com inibidores de NOS. Apesar do grande número de estudos nesta área, o papel do NO no aumento do fluxo de sangue muscular induzido por contração ainda é incerto. A maioria dos estudos, mas não todos, em humanos e animais mostraram que, embora o bloqueio da NOS reduza o fluxo muscular de sangue no

repouso, e durante a recuperação do exercício, não há nenhum efeito deste bloqueio sobre o aumento da perfusão muscular durante o exercício. Ainda não existem evidências conclusivas sobre os mecanismos subjacentes ao aumento multi-fase do fluxo sanguíneo muscular durante o exercício, assim como sobre o papel e potência das diversas substâncias vasoativas (RADEGRAN & HELLSTEN, 2000).

O exercício também provoca estresse oxidativo através da geração aumentada de intermediários reativos do oxigênio (ROI¹⁸) no músculo, assim como no sistema hematopoiético. A elevação de temperatura induzida pelo exercício também pode provocar o estresse oxidativo, uma vez que Salo et al. observaram que, com o aumento da temperatura, as mitocôndrias musculares sofriam um progressivo desacoplamento com geração aumentada de ROI.

Um papel para os intermediários reativos do oxigênio, produzidos primariamente como consequência do elevado ritmo de respiração mitocondrial é postulado na fadiga muscular. Considerando a capacidade potencial dos intermediários reativos do oxigênio de danificarem as proteínas intracelulares durante séries consecutivas de contrações musculares, a capacidade de rotas antioxidantes preexistentes pode ser complementada pela síntese de HSP. Aumentos no mRNA de HO-1, em particular, devem fazer parte de uma rota antioxidante induzível no músculo esquelético que é responsiva ao estresse metabólico associado com contrações musculares repetidas (FEHRENBACH and NIESS, 1999).

A ativação de neutrófilos descritas após exercício e um aumento dos produtos de peroxidação lipídica sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel

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

Segundo Salo et al. (1991) a hipertermia do exercício provocaria o desacoplamento mitocondrial, elevando a concentração de ubisemiquinona e aumentando a concentração de superóxido (O_2^-). Este ânion e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), subseqüentemente formado, podem ser responsáveis pela expressão aumentada de HSP70 e de outras HSP.

2.7. Proteínas de Choque Térmico e Citoproteção no Miocárdio

Diversos mecanismos de citoproteção cardíaca estão associados à expressão de HSP, a maior parte da atenção é voltada para os processos que envolvem a morte celular programada – apoptose. A maior via da apoptose envolve a liberação da citocromo C da mitocôndria. Esta se liga a uma proteína conhecida como Apaf-1 e desencadeia a sua oligomerização. O complexo formado, então atrai a pro-forma da

¹⁸ Reactive oxygen intermediates

enzima proteolítica caspase-9 que é clivada e passa a sua forma ativa, e por meio disso inicia-se o processo apoptótico. Interessantemente, diferentes tipos de HSP têm demonstrado inibir este processo em diferentes pontos. Foi demonstrado que a HSP27 é capaz de ligar-se a citocromo-c e prevenir sua ligação a Apaf-1 (GARRIDO et al, 1999; BRUEY et al, 2000). Inversamente, a HSP90 se liga a Apaf-1 e previne sua ligação a citocromo-c (PANDEY et al, 2000), enquanto a HSP70 previne a já oligomerizada Apaf-1 de recrutar a pro-caspase-9 (BEERE et al, 2000; SALEH et al, 2000).

Além de seu efeito anti-apoptótico mediado por caspases, a HSP70 parece apresentar mecanismos independentes de caspases (JÄÄTTELÄ et al, 1998). A capacidade da HSP70 de inibir a quinase C-Jun N-terminal (Jnk kinase), indutora de apoptose, parece ser a maneira independente de caspase pela qual a HSP70 inibe a morte celular programada (GABAI et al, 2000; PARK et al, 2001). Já foi demonstrado que o aumento da expressão de HSP70 em células cardíacas protege a célula da apoptose em decorrência de estímulos estressores como calor e isquemia (BRAR et al, 1999).

Além deste efeito inibidor de apoptose, as HSP's apresentam outros efeitos de proteção como, por exemplo, já foi demonstrado que a HSP27 pode proteger a integridade dos microtúbulos e do citoesqueleto de actina em miócitos e células endoteliais expostas à isquemia (BLUHM et al, 1998; LOKTIONOVA et al, 1998).

Além disso, a HSP90 tem demonstrado ligar-se a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e estimular sua atividade (GARCIA et al, 1998), enquanto o aumento da expressão da HSP70 aumenta a produção de NO em resposta à estimulação de

citocinas (BELLMAN et al, 2000). Essas observações são particularmente interessantes em vista das observações de que angina instável ativa ambas HSP72 e eNOS no coração humano (VALEN et al, 2000), enquanto o NO protege as células em cultura da morte induzida pelo TNF- α por induzir a expressão de HSP70 (KIM et al, 1997).

Pelo fato de as HSP, em particular a HSP70, protegerem a célula via múltiplos mecanismos regulatórios, é possível que estes efeitos possam ser utilizados terapeuticamente.

2.8 Regulação da Expressão de HSP70 no Miocárdio durante o Exercício

Com relação à sinalização e ativação do HSF1, ativador da expressão de HSP70, Russo et al (1984) foram os primeiros a observarem que a depleção do conteúdo de glutathiona resultava em concomitante aumento da expressão de HSP70. A partir deste momento, muitos outros trabalhos utilizando diversos modelos diferentes de manipulação do conteúdo intracelular de GSH (logo do estado redox da célula cardíaca) demonstraram que a oxidação e depleção de grupos tiols não protéicos levavam a ativação do HSF1 (Freeman et al, 1995; Hatayama et al, 1999; Huang et al, 1994; Jacquier et al, 1996; Liu et al, 1996; Zou et al, 1998) e levaram a hipótese de que a oxidação de grupos tiols levaria a ativação de HSF1. No entanto, em um estudo realizado por PAROO (2002), foi verificado que em ratos exercitados durante uma hora a 30m/min por 60 minutos, não havia correlação entre o conteúdo de glutathiona e a ligação do HSF ao HSE, uma vez que neste exercício não houver alterações no estado redox celular do coração, mas ainda assim ocorreram ativação e

ligação do HSF. Aparentemente, esta relação entre depleção de grupos tiols e HSF1 ocorre apenas em situações farmacológicas e não em fisiológicas.

Sessões de exercício agudo são associadas com um aumento da recuperação funcional, melhora da contratilidade e preservação da função metabólica durante a injúria causada por isquemia-reperfusão (PAROO, NOBLE et al, 2002; LOCKE, 1995). Entre os mecanismos moleculares envolvidos nesta citoproteção está a expressão de HSP70, uma proteína intracelular chave na restauração dos danos causados pelo estresse isquêmico, facilitando a recuperação do coração ao seu estado funcional normal (BENJAMIN et al, 1998).

Diversos trabalhos têm indicado que a simples ligação HSF1-HSE no DNA não é suficiente para induzir a ativação transcripcional do HSF1, sugerindo um evento adicional na regulação deste fator de transcrição (JURIVICH et al, 1992). Acredita-se que a hiperfosforilação do HSF1 em seus resíduos de serina seguida de sua ligação ao HSE inicie sua atividade (XIA et al, 1997).

A proteína quinase C ou PKC (quinase dependente de cálcio-fosfolípídeo) e a proteína quinase A ou PKA (quinase dependente de AMPcíclico), medeiam muitos processos de fosforilação em células cardíacas. Durante o exercício, níveis elevados de catecolaminas no plasma e coração levam ao aumento da atividade da PKC e PKA, e estas participam na regulação de processos de mobilização de substratos energéticos, mudanças de fluxo iônico, desenvolvimento de força contrátil bem como da expressão gênica (SUGDEN et al, 1995; FRANCIS et al, 1982). Já foi demonstrado que a administração de agonistas β -adrenérgicos que aumentam a atividade da PKA, potencializam a expressão de HSP70 durante uma sessão aguda

de exercício (PAROO et al, 1999), enquanto que autores demonstraram que o tratamento com inibidores de PKC diminuía a cardioproteção induzida pelo exercício (YAMASHITA et al, 2001).

A administração do inibidor de PKA (H-89), atenuou a elevação do RNAm da HSP70 e subsequente expressão de HSP70 induzida pelo exercício. Em contraste, a administração do inibidor de PKC (CHEL) não afetou a formação de RNAm da HSP70 bem como seu acúmulo intracelular. Isso sugere que, ao contrário do que ocorre em cultura de células e com o uso de outros agentes estressores, a regulação do gene da HSP70 no exercício agudo depende apenas da PKA, e não de ambas (MELLING & NOBLE, 2004).

É sabido que a ativação do HSF1 envolve uma série complexa de eventos regulatórios, que incluem a localização nuclear, oligomerização, ligação ao HSE e finalmente à transcrição do gene (SARGE et al, 1993; WESTWOOD et al, 1991). No entanto, em adição a estes eventos, muitos estudos têm sugerido outro mecanismo de controle: a regulação da atividade de transcrição do HSF1 (JURIVICH et al, 1992; BRUCE et al, 1993).

Numerosos estudos demonstraram que a hiperfosforilação induzida do HSF1, seguida de sua ligação ao HSE dá início a sua atividade. As evidências deste mecanismo baseiam-se em estudos que demonstram a redução da eletromobilidade reduzida do HSF1, após um tratamento com fosfatases (SARGE et al, 1993). Estas observações sugerem que a fosforilação seja um mecanismo importante para a translocação do HSF1 ao núcleo, e não a sua ativação efetiva.

Em estudos com cultura de células, o inibidor da PKC atenuou a fosforilação do HSF1 e a subsequente transcrição do gene da HSP70 (OHNISHI et al, 1999). A importância da fosforilação como mecanismo regulatório da ativação do HSF1 ainda não é esclarecida, mas estudos recentes demonstraram que a ativação do HSF1 ocorre mesmo na ausência da fosforilação. Provavelmente, o exercício induz mecanismos regulatórios intracelulares diferentes dos que controlam a ativação do HSF1 na resposta ao choque térmico. Recentemente foi sugerido que a fosforilação do HSF1 só seria necessária para a máxima ativação transcripcional (HOLMBERG et al, 1998).

Foi demonstrado que a fosforilação dos resíduos de serina 303, 307 e 363 diminuem a ativação do HSF1 ao invés de ativá-lo (KNAUF et al, 1996; KLINE et al, 1997). A via repressiva da fosforilação da ser303 e 307 na regulação da atividade do HSF1 é um potencial alvo para a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) por sua capacidade de fosforilar estes resíduos (XAVIER et al, 2000; CHU et al, 1998). Foi demonstrado que a ativação de MAPK e ERK1/2, diminuem a atividade transcripcional do HSF1, mas não alteram a sua localização, oligomerização nem a sua ligação ao DNA (CHU et al, 1996). Estudos com a PKA demonstraram que ela participa de inúmeras vias de sinalização das MAPK's, incluindo ERK 1/2 (HAFNER et al, 1994; DUMAZ et al, 2003).

Outras modificações pós-translacionais além da fosforilação podem participar na regulação da atividade do HSF1. KIANG et al (1994, 1998), demonstrou a participação dos níveis de cálcio intracelular na regulação da expressão do gene da HSP70. Estes estudos demonstraram que o uso de quelantes de cálcio (BAPTA-AM)

atenua a elevação de RNAm de HSP70 bem como sua síntese em células cardíacas. No coração, a PKA é o principal regulador de cálcio intracelular através da fosforilação dos canais de cálcio tipo-L (PELZER et al, 1990; KEEF et al, 2001).

A maioria dos trabalhos que examinaram a regulação da cardioproteção mediada por HSP70, eram focadas na PKC. Estes estudos demonstraram que a PKC é essencial para os processos de cardioproteção, mas as evidências da sua relação com a expressão de HSP70 não eram conclusivas (YAMASHITA et al, 1997; KUKREJA et al, 1999; JOYEUX et al, 1997). Em um estudo de MELLING & NOBLE (2004), foi sugerido que a PKC não estaria envolvida nos eventos iniciais da ativação do gene da HSP70, mas 24 horas após o exercício se faria importante, levando a um mecanismo de proteção posterior à célula cardíaca.

Outro fator indutor da síntese de HSP70 no miocárdio e esquelético são as mudanças bruscas de temperatura. Com o objetivo de verificar a influência da temperatura na expressão de HSP70 em uma sessão aguda de exercício, KIM et al (2004), realizaram um experimento com ratos Sprague-Dawley divididos em três grupos de exercício (esteira, 17m/min, 0% de inclinação) em diferentes condições ambientais: frio (11°C), controle (23°C) e quente (41°C). Após o exercício, a temperatura retal dos animais foi aumentada nos grupos exercício controle e quente, mas apresentou uma pequena queda no grupo frio. O tempo de exaustão dos animais variou em 44±18 min (calor), 55.4±11min (frio) e 102±39min (controle). A expressão de HSP70 foi aumentada nos grupos exercício controle e exercício calor, permanecendo inalterada no frio. Estes dados sugerem que as temperaturas internas aumentadas levam a expressão aumentada de HSP70.

A indução de HSP70, pelo exercício, segundo Locke et al. (1995), confere ao miocárdio uma melhor recuperação pós-isquêmica e deve ser responsável, pelo menos em parte, pela proteção miocárdica associada ao exercício. Em concordância com estes autores, Powers et al. (1998) sustentam que, em ratos, a melhora da contratilidade e a redução da peroxidação lipídica no miocárdio submetido a condições de isquemia/reperfusão, *in vivo*, parece estar relacionada com aumentos na concentração de HSP70 e na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e fosfofrutoquinase (PFK), induzidos pelo treinamento de resistência¹⁹. Locke et al. (1995), examinando a ativação do HSF no coração de ratos Sprague-Dawley submetidos a corrida em esteira (24 m/min) por períodos de 0, 20, 40 ou 60 min ou até a exaustão (102 ± 7 min), observaram que esta ocorria em 80% dos animais que corriam pelo menos 40 min. Em contraposição, Taylor et al. (1999) observaram que sessões agudas de exercício podem ter efeitos cardioprotetores sem elevação concomitante de HSP70.

A intensidade do exercício parece ser um fator crítico na evocação da resposta cardioprotetora da HSP70, conforme demonstrado por Noble et al. (1999). Estes autores examinaram a possibilidade da corrida espontânea de ratos em uma roda, conferirem uma resposta similar àquela observada em resposta ao exercício forçado em esteira. Eles relataram que os níveis de HSP70 eram quatro vezes maiores, em ambos os ventrículos dos animais forçados a correr na esteira, em comparação com o ventrículo direito dos ratos que se exercitavam espontaneamente, mesmo que

¹⁹ endurance

ambos tenham corrido uma distância similar. A expressão de HSP73 e HSP75, por outro lado, não eram diferentes entre os grupos.

Para determinar os efeitos do exercício sobre a expressão de HSP70 em corações submetidos à isquemia-reperfusão, TAYLOR et al (1999) utilizou ratas Sprague-Dawley divididas em 1 dia de corrida (1DR), três dias (3DR), 1 dia no frio de 8°C (1CR), sedentárias e sedentários com choque térmico (HS). O exercício era composto de 100min a uma velocidade de 20m/min com 6° de inclinação. Os corações eram isolados e a isquemia induzida; após esta, eram recuperados por 30 min e os dados eram coletados. Em todos os parâmetros, o coração dos animais exercitados se encontravam recuperados do estresse da isquemia-reperfusão, no entanto, os valores de HSP72 nos grupos sedentários, HS, 1DR e 3DR, mas não em CR. A partir destes dados, os autores concluíram que o exercício produz cardioproteção sem a elevação dos níveis de HSP72.

2.9 Músculo esquelético, exercício e expressão de HSP

Células submetidas a estresse podem sobreviver ou morrer dependendo do tipo de célula, do tipo e intensidade do estresse e de outros fatores. A exposição prévia das células a condições estressantes não-letais pode suscitar a síntese de HSP e proteger contra os efeitos lesivos de novas exposições (MEYER e DA SILVA, 1999). O exercício físico de duração e intensidade adequadas é um estresse capaz de perturbar a homeostasia celular e proporcionar estímulos como elevação de temperatura, diminuição de pH, aumento da concentração de íons cálcio e diminuição da disponibilidade de oxigênio (COYLE et al., 2000), assim como a redução das

reservas de glicogênio (FEHRENBACH and NIESS, 1999). Essas condições são bastante semelhantes àquelas capazes de ativar o HSF e promover a síntese de HSP (LOCKE and NOBLE, 1995; FEHRENBACH and NIESS, 1999). Na verdade, vários autores afirmam que o exercício é um estímulo adequado para promover aumentos na expressão de proteínas de estresse (LOCKE and NOBLE, 1995; ESSIG and NOSEK, 1997; FEHRENBACH and NIESS, 1999). Em consonância com esta afirmação está a observação de que o ritmo de síntese de HSP70 aumenta, tanto no sóleo como no extensor longo dos dedos, após uma única sessão de exercício (HERNANDO e MANSO, 1997). Também foram observados níveis aumentados de mRNA codificando para HSP70, em função do exercício, choque térmico e estresse oxidativo, em músculo cardíaco e esquelético (FEHRENBACH and NIESS, 1999).

Algumas HSP são sintetizadas com o aumento da duração do exercício, enquanto outras são sintetizadas apenas em condições de exaustão ou próximo a ela (LOCKE and NOBLE, 1995). Febbraio e Koukoulas (2000) examinaram o efeito do exercício até a exaustão sobre a expressão do mRNA codificando para HSP70 em cinco homens saudáveis que pedalarão até a exaustão numa intensidade de 63% da captação máxima de oxigênio. Foram obtidas amostras do músculo vasto lateral e medida a temperatura muscular em repouso, aos 10 min de exercício, aproximadamente 40 min antes da fadiga (144 ± 7 min) e no momento em que ocorreu a fadiga (186 ± 15 min). A temperatura muscular aumentou inicialmente (10 min) e então se manteve estável até o final do exercício. A concentração de lactato também aumentou inicialmente (10 min), mas não era diferente dos valores de repouso 40 min antes e no momento em que ocorreu a fadiga. O conteúdo de

glicogênio muscular, por sua vez, diminuiu progressivamente ao longo do exercício, passando de 486 ± 74 mmol/kg de peso seco no repouso para 25 ± 7 mmol/kg de peso seco no momento da fadiga. A concentração de mRNA HSP70 aumentou $2,2 \pm 0,5$ vezes 40 min antes do momento de fadiga e $2,6 \pm 0,9$ vezes no momento da fadiga, mas não era diferente dos valores de repouso aos 10 min de exercício. Assim, os dados sugerem um aumento progressivo no conteúdo de mRNA codificando para HSP70, indicando que o exercício agudo é capaz de desencadear a resposta de estresse.

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

O aumento coincidente na concentração de catecolaminas e na síntese de HSP70, levou Paroo e Noble (1999) a estudarem o papel dos receptores beta-adrenérgicos na expressão dessas proteínas. Os resultados obtidos levaram os autores a concluir que o receptor beta-adrenérgico não induz a síntese de HSP70, per

se, mas deve estar envolvido na complexa regulação da resposta de estresse ao exercício.

Uma das teorias para explicar a fadiga de baixa frequência (LFF²⁰) aponta a interrupção de algum estágio no processo de acoplamento excitação-contração em decorrência da desnaturação, por espécies reativas do oxigênio (ROS²¹), de uma ou mais proteínas associadas com o mecanismo de liberação do Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático. Dado o potencial das ROS danificarem proteínas intracelulares durante séries subsequentes de contrações musculares, a capacidade dos sistemas antioxidantes preexistentes deve ser complementada pela síntese de HSP induzíveis (ESSIG and NOSEK, 1997). A quantidade de mRNA para HO-1, importante proteína de estresse oxidativo, aumenta no músculo após repetidas contrações. A ocorrência deste aumento depende da geração ativa de tensão, não ocorrendo no caso da geração de tensão por processos passivos. Aumentos na expressão de mRNA codificando para HO-1 deve fazer parte de um sistema antioxidante induzível pelo estresse metabólico resultante de contrações musculares repetidas. A análise por Northern blot mostrou também que o mRNA codificando para HSP70 estava 3,5 a 15,5 vezes maior do que os valores de controle (ESSIG et al. 1997).

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

²⁰ low-frequency fatigue

resultados obtidos proporcionam evidência direta de que as mitocôndrias do músculo cardíaco produzem um intermediário semelhante ao radical hidroxila (LEEUWENBURGH et al. 1999).

Exercícios de intensidades não habituais e extenuantes podem causar dano ao músculo esquelético, especialmente se envolverem contrações excêntricas.²², o que pode ser constatado, segundo Clarkson e Sayers (1999), diretamente em nível celular (diminuição da quantidade e da atividade de proteínas transportadoras de glicose e lactato/H⁺), ou indiretamente a partir de vários índices da função muscular (menor capacidade de alongamento e de gerar tensão). O estresse fisiológico associado com dano muscular resulta em resistência sistêmica à ação da insulina. Os mecanismos moleculares associados a esta resistência, segundo Del Aguila, et al.(2000), envolvem a menor ativação do IRS-1²³, da fosfatidilinositol 3-quinase e da proteína quinase B, o que leva, presumivelmente, a uma menor captação de glicose mediada pela insulina. Uma vez que a produção de TNF α se correlaciona ($r = 0,77$, $P < 0,05$) com a menor ação da insulina sobre a PI 3-quinase, é possível que este fator seja responsável pela diminuição da transdução do sinal da insulina (Del AGUILA et al. 2000). Esta maior resistência à insulina poderia levar a expressão aumentada de GRP75 e GRP78.

A atividade física prolongada também pode determinar maior expressão de GRP75 e GRP78, na medida em que leva à progressiva depleção de glicose e das

²¹ reactive oxygen species

²² Contrações em que o músculo se alonga apesar de estar desenvolvendo tensão.

²³ insulin receptor substrate-1

reservas de glicogênio muscular, fenômeno que se correlaciona fortemente com fadiga (ESSIG and NOSEK, 1997).

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

2.10 Músculo esquelético, treinamento físico e expressão de HSP

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

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

O conteúdo muscular de HSP70, em ratos, está relacionado com a proporção de fibras que contém meromiosina pesada (MHC²⁴) do tipo I, uma vez que a HSP70 é expressa constitutivamente neste tipo de fibra muscular. Assim, músculos como o sóleo, composto primariamente por fibras do tipo I, apresentam um elevado conteúdo de HSP70, parecendo estar em um estado de choque térmico contínuo. Em

²⁴ myosin heavy chain

contraste, músculos como o gastrocnêmio, composto primariamente por fibras do tipo IIb, apresentam um baixo conteúdo de HSP70 (LOCKE and NOBLE, 1995). O extensor longo dos dedos também apresenta uma expressão constitutiva de HSP70 menor que o sóleo, enquanto a expressão de HSP73 é semelhante (HERNANDO e MANSO, 1997). O aumento proporcional de MHC do tipo I e de HSP que acompanha a hipertrofia muscular compensatória do músculo plantar está de acordo com a idéia de que este tipo de MHC está associado à expressão de proteínas de choque térmico (LOCKE and NOBLE, 1995).

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

2.11 Bombas GS-X

Plantas e animais eliminam uma vasta gama de toxinas lipofílicas do citosol após sua conjugação com glutathiona (ISHIKAWA et al, 1992; MARTINOIA et al, 1993; LI et al, 1995). Esse processo de transporte é mediado pelas bombas GS-X, uma grande família de ATPases transportadoras de ânions dependentes de magnésio. O termo “bomba GS-X” foi originalmente proposto, baseado na sua

atividade transportadora de conjugados de xenobióticos com alta afinidade por S-conjugados de glutatona, dissulfeto de glutatona e cisteinil leucotrienos. As propriedades cinéticas e a especificidade por substratos da bomba GS-X tem sido intensamente estudados usando vesículas de membrana plasmática de diferentes fontes biológicas. Evidências acumulativas, sugerem que a bomba GS-X apresenta uma larga especificidade de substratos orgânicos e que por meio disso, medeia importantes funções fisiológicas na inflamação, estresse oxidativo, metabolismo de xenobióticos e resistência a drogas anti-tumor.

Nos últimos anos, ocorreu um notável progresso na compreensão da natureza molecular das bombas GS-X. A superexpressão do gene das proteínas multidroga resistentes – MRP1 (COLE et al, 1992; ZAMAN et al, 1994) em células de câncer humano foram primeiramente reportadas em aumentar o transporte de GS-conjugados ATP dependente, demonstrando que o gene da MRP1 codifica a bomba GS-X humana (MULLER et al, 1994; LEIER et al, 1994). Uma bomba GS-X específica do fígado, chamada de cMOAT, já foi clonada de fígado de ratos e exibe uma extensa homologia com a MRP1 humana (PAULUSMA et al, 1996; BUCHLER et al, 1996; ITO et al, 1996). Pelo fato desta bomba ter importante papel na eliminação de anions orgânicos nos hepatócitos, mutações no gene da cMOAT implica em hiperbilirrubinemia associada.

2.12 Metabolismo da glutatona e a bomba GS-X

Uma das maiores funções da bomba GS-X é a excreção e/ou seqüestro de compostos tóxicos, atuando como um sistema de proteção. O metabolismo e a detoxificação de xenobióticos é realizado em três estágios: Na fase 1, os xenobióticos e substancias endógenas são oxidados, reduzidos ou hidrolisados para expor ou introduzir um grupo funcional de reatividade apropriada. A citocromo P450 e outras oxidases de função mista são exemplos de enzimas da fase 1 que conferem a eletrofilicidade requerida sobre componentes não reativos para subsequente metabolismo pelas enzimas da fase 2. Na fase 2, os derivados ativados são conjugados com GSH, ácido glucurônico ou sulfato, pela ação das GSH transferases, UDP-glucuronil transferases e sulfotransferases. Na fase 3, os conjugados são transportados do citosol para o meio extracelular ou para compartimentos intracelulares. O principio destas reações é que a conjugação confere a carga negativa e aumenta a hidrossolubilidade necessária para promover a extrusão pela bomba GS-X ou outros transportadores ainda não identificados.

A função da bomba GS-X é diretamente ligada com o metabolismo celular da GSH. A glutatilação do composto a ser exportado, promove a carga negativa que permite o seu reconhecimento pela bomba GS-X. GSH apresenta duas importantes características na sua estrutura, conhecidas como ligação γ -glutamato e grupo SH, ambos intimamente ligados a sua estabilidade intracelular e suas funções biológicas. O conteúdo intracelular de GSH em células de mamíferos é na ordem de 1-10mM (MEISTER et al, 1989), que é mais elevada que a concentração de ATP. Em muitas

células, o conteúdo de GSH representa mais de 90% do total de enxofre não protéico. Esta alta concentração intracelular de GSH é possível, pela ação da estrutura da ligação γ -glutamato, que protege a molécula de GSH da clivagem protéica. O grupo SH da GSH é fortemente nucleofílico e confere à molécula a habilidade de reagir com uma grande variedade de agentes, incluindo radicais livres, espécies reativas de oxigênio, metais pesados e componentes tóxicos eletrofílicos, atuando na detoxificação de células vivas, bem como, possivelmente, reagindo com diversas proteínas e enzimas e com isso alterando sua função normal.

A biossíntese de glutathiona é realizada no citosol. A reação consiste de dois passos catalisados pela γ -glutamilcisteína sintetase e pela GSH sintetase, onde cada etapa requer uma molécula de ATP. A γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GCS) catalisa o primeiro passo onde uma ligação amida é formada entre o grupo amino da cisteína e o γ -carboxil do glutamato. No segundo passo, a GSH sintetase catalisa a reação entre a glicina e o grupo carboxil da cisteína da γ -glutamilcisteína. A reação catalisada pela γ -GCS é a etapa limite para a síntese de GSH e é controlada por feedback negativo a partir de seu produto, GSH via inibição competitiva não alostérica (MEISTER et al, 1983).

A via de inativação de drogas mediada pela GSH é biologicamente um mecanismo "caro". A síntese de GSH e o transporte de S-conjugados do citosol, requer pelo menos três moléculas de ATP em ordem de metabolizar 1 mol de moléculas de droga. Isso parece desfavorável quando se compara com a produção de apenas duas moléculas de ATP produzidas na glicólise a partir de uma molécula de glicose. No entanto, como este mecanismo é encontrado nos reinos animal e

vegetal sendo ubíquo e muito bem conservado, sugere que esta via é fundamental para a sobrevivência das células.

De fato, a GSH aparece como fundamental via de proteção de células vivas sobre condições de estresse oxidativo (SIES et al, 1985). O conteúdo intracelular de GSSG é mantido a níveis baixos (menos de 3% do conteúdo total de GSH) pela ação da GSSG redutase e é aumentado pela reação da GSH peroxidase, levando a um aumento do conteúdo intracelular de GSSG e seu efluxo da célula. O efluxo de GSSG já foi observado em diversos tipos celulares, incluindo eritrócitos, fígado, pulmão e coração. É importante notar que os estudos da bomba GS-X começaram com a descoberta do efluxo de GSSG de eritrócitos humanos.

Em 1969, um trabalho feito por Srivastava e Beutler, demonstrou que o transporte de GSSG em eritrócitos humanos era unidirecional e dependente de energia. O transporte de GSSG ocorria mesmo contra um gradiente de concentração e que levava quase a exaustão de ATP quando eram incubados com drogas citotóxicas.

Em 1984, foi demonstrada pela primeira vez, a liberação de GSSG e de conjugados de GSH a partir de corações isolados e perfundidos (ISHIKAWA et al, 1984). O coração é órgão continuamente exposto a altas concentrações de sangue oxigenado vindo dos pulmões. As cardiomiopatias resultam de danos oriundos de estresse oxidativo imposto por hiperoxia ou administração de certas drogas, bem como situações de isquemia-reperfusão. O efluxo de GSSG foi sugerido como importante mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (ISHIKAWA et al, 1986). A relação entre efluxo de GSSG versus a razão citosólica de ATP/ADP = 10, sugerindo um processo de transporte ATP dependente. O efluxo de GSSG do

coração não é afetado por epinefrina, norepinefrina ou dibutilil AMP cíclico, sugerindo que o transporte é independente de regelações hormonais α e β -adrenérgicas (ISHIKAWA et al, 1986). A bomba GS-X cardíaca mostrou ter alta afinidade por conjugados de glutathiona com longa cadeia alifática de carbonos.

No fígado, GSSG e GS-conjugados são predominantemente excretados na bile. Akerboom et al (1982) demonstraram que o transporte hepatobiliar de GSSG era inibido por GS-conjugados, sugerindo a existência de um transportador comum para GSSG e GS-conjugados. Contudo, o potencial de membrana ter sido especulado como força de direção para o transporte de GSSG e GS-conjugados (INOUE et al, 1984). Kobaiashi e colaboradores evidenciaram, ao utilizar vesículas de membranas de canalículos biliares, que o transporte de S-(2,4-dinitrofenil-glucuronídeo)-glutathiona (GS-DNP) era ATP dependente. A inibição do transporte de glucuronídeos conjugados pela GS-DNP sugeriu que a eliminação hepatobiliar destes compostos era mediada pela bomba GS-X hepática (KOBASHI et al, 1991).

A descoberta de dois tipos de icterícia em ratos, mutantes para bomba GS-X, Wistar e Sprague-Dawley levou ao aumento dos estudos sobre a bomba GS-X dos hepatócitos. O efeito predominante era a hiperbilirrubinemia conjugada e a secreção falha de GSH, GSSG, GS-conjugados (OUDE et al, 1989; 1990; TAKIKAWA et al, 1990), complexos GSH-metais (HOUVEN et al, 1990), conjugados de bilirrubina-glucuronídeos (JANSEN et al, 1987) e cisteinil-leucotrienos (HUBER et al, 1987; ISHIKAWA et al, 1990), assim como anions orgânicos (JANSEN et al, 1987; SATHIRAKUL et al, 1993). Estes achados estimulam a idéia de que a bomba GS-X hepatobiliar apresenta especificidade para diferentes anions orgânicos. A bomba GS-

X hepática também é conhecida como “Transportador canalicular de diferentes ânions orgânicos (cMOAT)”.

2.13 Proteínas Multidroga Resistentes

A família das MRP`s foi introduzida na temática sobre resistência múltipla a drogas em 1992 quando Susan Cole e Roger Deeley clonaram a proteína associada ao gene multidroga resistente, conhecido atualmente como MRP1 (COLE et al, 1992); logo em seguida, foi clonada a MRP2 em 1996 (FLENS et al, 1996; BUCHLER et al, 1996; TANIGUCHI et al, 1996). Posteriormente, ficou conhecido e existência de cinco membros desta família de proteínas (KOOL et al, 1997). A MRP6 foi adicionada a este grupo em 1998 (KOOL et al, 1998 e 1999) e já foi observada a presença de um sétimo membro desta família.

Por serem proteínas transportadoras ligadoras de ATP, são chamadas também, de “ATP-binding cassette transporters” ou ABC transporters. Atualmente, pelo menos 21 novos transportadores ABC diferentes já foram identificados com base em suas seqüências conservadas de aminoácidos (ALLIKMETS et al, 1996). Algumas destas MRP`s são conhecidas por outros nomes, como demonstrado na figura abaixo (fig.1). MRP2, como já anteriormente dito, é conhecida como cMOAT (JANSEN et al, 1985).

ABCC nomenclatura	MRP nomenclatura	Outros nomes adotados	Interações Fisiológicas
ABCC1	MRP1	GS-X Bomba, LTC4 ATPase, and	A mais expressa bomba carreadora MRP/GS-X. Carreador fisiológico de LTC ₄ and GSSG das células

		DNP-SG ATPase	para o espaço extracelular; co-transportadora de componentes anfífilos conjugados com GSH das células.
ABCC2	MRP2	cMOAT-1	Transporte de ânions inorgânicos, como bilirrubina e compostos sulfatados e glucuronídeos, sulfatos e glutatona conjugados na bile; co-transporte de componentes anfífilos conjugados com GSH sua deficiência hereditária resulta em hiperbilirrubinemia conjugada II/síndrome de Dubin-Johnson.
ABCC3	MRP3	cMOAT-2 or MOAT-D	Transportador hepático de ânions orgânicos.
ABCC4	MRP4	MOAT-B	Transportador de nucleotídeos cíclicos, componentes anti-retrovirais, e ácidos sulfatados da bile. É o transportador de antiinflamatórios não esteróides sensível a prostaglandinas.
ABCC5	MRP5	MOAT-C	Confere resistência a drogas anti-retrovirais e anticâncer.
ABCC6	MRP6	-	Confere resistência a drogas anticâncer. Sua deficiência hereditária resulta em pseudoxanthoma elasticum, uma desordem multisistêmica que afeta a pele, olhos e os vasos sanguíneos.
ABCC7	-	CFTR	Medeia o transporte de GSH. É o regulador da condutância transmembrânica na fibrose cística..
ABCC8	-	SUR-1	Um receptor de sulfoniluréia não apresenta função intrínseca de transporte, nem ativo nem passivo, mas esta associada com a proteína do canal de potássio Kir6.1 ou Kir6.2 que forma o canal de potássio sensível ao ATP (K_{ATP}). Implicado na persistência da hipoglicemia hiperinsulinêmica na infância.
ABCC9	-	SUR-2	Outro receptor de sulfoniluréia que não apresenta função intrínseca de transporte. Mutações neste, provoca ativação Na-ATP-dependente de canais de potássio ATP-sensíveis, com implicações que induzem a abertura deste.
ABCC10	MRP7	-	Carreador de ânions anfipáticos, para transporte 17- β -estradiol 17-(β -glucoronídeo resistência a drogas anticâncer).
ABCC11	MRP8	-	Transporta purinas e pirimidinas cíclicas bem como seus análogos.
ABCC12	MRP9	-	Altamente expresso em câncer de mama.
ABCC13	-	-	Não é uma ABC funcional.

Figura 1. Revisão dos nomes alternativos para a família das MRP's.

A homologia entre os membros da família das MRP's é alta entre MRP1, 2, 3 e 6. Estes transportadores, dividem uma característica comum de apresentarem um segmento TMDoLo (uma extensão N-terminal com cinco domínios transmembrana conectados com um núcleo do tipo glicoproteína P – Pgp-like) (BAKOS et al, 1996;

TUSNÁDY et al, 1997). Este segmento é ausente na MRP 4 e 5, e esta estrutura básica é essencial para a atividade transportadora na MRP1 (BAKOS et al, 1998).

2.14 A família das bombas MRP`s

Como citado anteriormente, a família das MRP`s humanas consiste de pelo menos treze membros (ver fig.1). A estrutura das MRP`s, prevista por inúmeros métodos computacionais, mostra notáveis semelhanças de pelo menos quatro dos seis membros da família. Em contraste com a organização dos típicos seis segmentos transmembrana descritos para a família da P-glicoproteína (LOO et al, 1999; AMBUDKAR et al, 1999), a MRP exibe um domínio amino-terminal adicional representado pela extensão de aproximadamente 200 aminoácidos. Esta topologia distingue a MRP dos outros transportadores ABC (TUSNADY et al, 1997). Os melhores membros caracterizados são a MRP1 (COLE et al, 1992) e o membro apicalmente localizado MRP2 (BUCHLER et al, 1996; TANIGUCHI et al, 1996). A MRP1 consiste em uma proteína de 1531 aminoácidos, e seu gene está localizado no cromossomo 16p13.12-13 pesando aproximadamente 200kb; contém 31 éxons e nenhum íntron (GRANT et al, 1997). A elucidação da seqüência e da função da MRP1 (JEDLITSCHKY et al, 1994; LEIER et al, 1994) sugere a presença funcional de proteínas semelhantes em diversos tecidos. Por exemplo, a comparação de transportadores obtidos a partir das membranas de vesículas dos canalículos hepáticos de rato, resultaram na caracterização e identificação da MRP2, uma

isoforma apical da MRP1 (MAYER et al, 1995; PAULUSMA et al, 1996). Esta proteína, além de ser encontrada na membrana dos hepatócitos, se faz presente em outros domínios apicais como no epitélio do túbulo proximal dos glomérulos renais (SCHAUB et al, 1997 e 1999).

A íntima relação entre MRP1 e 2 é também evidente na tipologia destes transportadores. Diversos métodos foram utilizados para predizer a organização transmembrana da MRP1 e 2 humana. Entre estes métodos, incluem a análise computacional, análises mutacionais e experimentos limitados por proteólise (BAKOS et al, 1996), assim como estudos de inserção de epítomos (KAST et al, 1998 e 1999; HIPFNER et al, 1996). A maioria dos estudos se focou na predição topológica da MRP1, mas outros se focaram na eletrofilicidade e em programas de predição transmembrana, demonstrando a próxima relação entre MRP1 e 2. Ambos transportadores apresentam um núcleo estrutural para interação multidroga (MDR-like), duas regiões transmembrana com dois domínios de ligação para ATP e uma terceira região transmembrana amino-proximal, como se observa na figura 2.

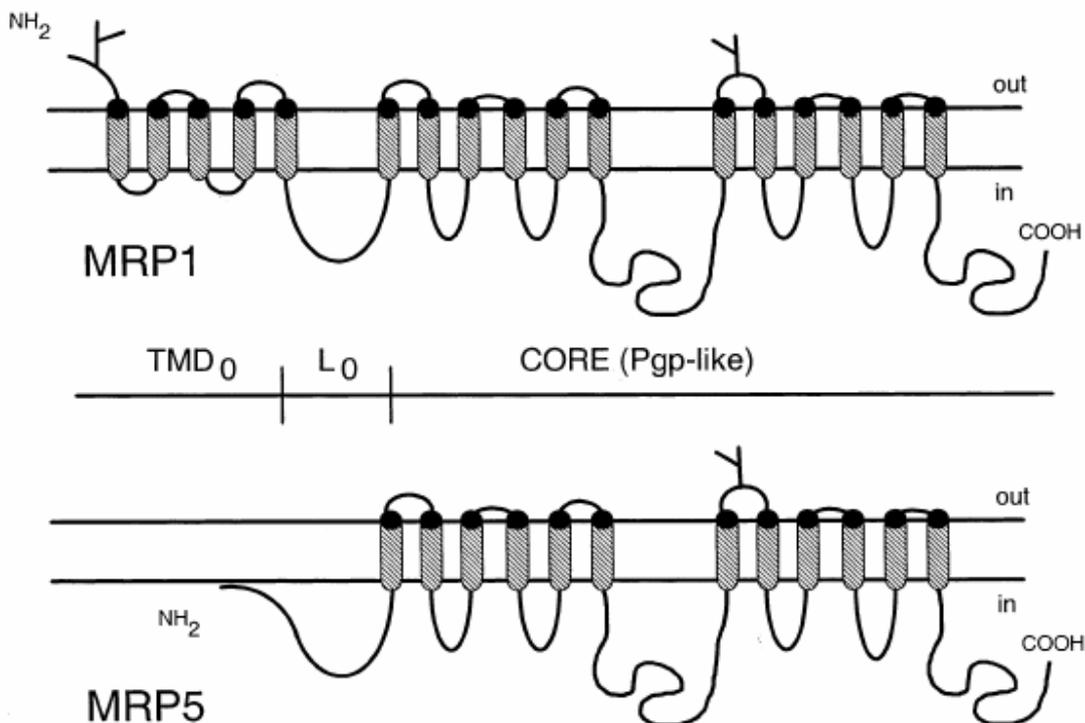


Figura 2. Modelo topológico da estrutura da MRP1 e 5. Núcleo glicoproteína-like (Pgp-like); Extensão N-terminal extra com cinco domínios transmembrana (TMD₀); Domínio de ligação citoplasmática (L₀).

Uma notável semelhança topológica entre ambas as proteínas foi encontrada na região amino-terminal. A terminação amino parece ser extracitosólica na maioria das predições; isto foi descrito primeiramente em MRP2 e depois em MRP1 (CUI et al, 1999). Estes estudos demonstraram experimentalmente a localização extracelular do domínio amino-terminal.

A MRP3, 4 e 5 são codificadas por diferentes genes localizados em diferentes cromossomos. A MRP3 no cromossomo 17q21.3, a MRP4 no cromossomo 13q31-32 e a MRP5 no cromossomo 3q27 (KOOL et al, 1995). Além disso, a MRP3 é mais

bem caracterizada em respeito a sua localização e em parte a respeito de sua função transportadora (HIROHASHI et al, 1999; KONIG et al, 1999; KOOL et al, 1999). A distribuição tecidual da MRP3 é semelhante a MRP2, ambas expressas abundantemente no fígado, cólon e rim (KONIG et al 1999). MRP3 é localizada basolateralmente na membrana de hepatócitos como já estudado por microscopia de fluorescência (KOOL et al, 1999).

Pouco se sabe a respeito da localização precisa de MRP4, 5 e 6. Sabe-se que a MRP4 tem função de bomba de efluxo drogas contra o vírus da imunodeficiência (SCHUCTZ et al, 1999) e que ela apresenta preferência por conjugados fosfatados, não se sabe a respeito de sua função no transporte de GSH, glucuronídeo ou conjugados com sulfatos. Com relação a MRP5, esta se apresenta como um transportador de anions orgânicos conjugados com GSH. A função da MRP6 permanece desconhecida, mas recentemente foi associada à resistência ligada a antraciclina; é altamente expressa nos rins e fígado, sendo pouco encontrada em outros tecidos (KOOL et al, 1999). A tabela 1 resume a localização das MRP`s nos diversos tecidos.

	Atividade GS-X	Transporte de Drogas	Localização no corpo
MRP1	SIM	SIM	Geral, mas pouco no Fígado
MRP2	SIM	SIM	Fígado, Rim e Intestino
MRP3	SIM	SIM	Fígado, Adrenais, Pâncreas, Rim e Intestino
MRP4	Não Sabe	Não Sabe	Próstata, Pulmão,

			Músculo, Pâncreas, Testículo e ovário
MRP5	SIM	Não Sabe	Geral
MRP6	Não Sabe	Não Sabe	Fígado e Rim

Tabela 1. Isoformas de MRP. Atividade GS-X, transportadora de drogas e localização no corpo.

2.15 Substratos e Propriedades cinéticas

Conforme discutido anteriormente, a MRP1 funciona como uma bomba ATP dependente unidirecional para S-conjugados de glutathione-leucotrieno C4 (LEIER et al, 1994), a especificidade pelo substrato desta proteína transportadora, foi estudada intensamente usando vesículas de membrana de células que expressavam a proteína recombinante em altos níveis (LEIRE et al, 1998; JEDLITSCHKY et al, 1997; RENES et al, 1999). A faixa de substratos inclui anions anfífilos, principalmente compostos lipofílicos conjugados com glutathione, glucuronato ou sulfato, incluindo cisteinil-leucotrienos, bilirrubina glucoronizada e 17 β -glucuronil estradiol, assim como componentes endógenos. Os Leucotrienos conjugados com GSH é o substrato com maior afinidade ($K_m=0,1\mu M$). O dissulfeto de glutathione também é exportado pela MRP1, no entanto, apresenta baixa afinidade ($K_m=100\mu M$) (LEIER et al, 1996), indicando que a seu transporte no processo de estresse oxidativo é associado com a elevação de sua concentração. O transporte de glutathione reduzida não foi detectado nestes estudos com vesículas (LEIER et al, 1996). No entanto, a glutathione reduzida

pode servir como co-substrato neutro ou substância catiônica. O transporte de algumas drogas, como a vincristina e daunorubicina, só é realizado pela MRP1, quando em presença de GSH (LOE et al, 1998). Ambas as drogas, também são substratos para a MDR1 P-glicoproteína que, em contraste com a MRP1, transporta estes componentes independentemente da presença de GSH (AMBUDKAR et al, 1999). Para algumas drogas citostáticas, sua conjugação com GSH ou glucuronatos é necessária para que sejam identificadas pela proteína, sendo, por tanto, substratos para MRP1.

A especificidade da MRP2 é, apesar de sua semelhança com a MRP1, menor para leucotrienos C4 (cerca de 4 vezes maior) e por 17 β -estradiol cerca de 5 vezes maior (CUI et al, 1999), enquanto bilirrubina glucuronada é preferencialmente transportada por MRP2.

A MRP3, exibe, conforme citado anteriormente, similaridade na distribuição tecidual, mas é localizada na membrana basolateral (KONIG et al, 1999; KOOL et al, 1999), e também apresenta função de transportar conjugados, tendo alta afinidade por glucuronisídeos e baixa afinidade por leucotrienos C4 (JEDLITSCHKY et al, 1996).

2.16 Liberação de Glutathione pelas Isoformas de MRP

O transporte de GSH de diversas células envolve os membros da família da MRP (LOE et al, 1996 e 1998; ZAMAN et al, 1995; RAPPA et al, 1997; PAULUSMA et al, 1999; REBBEOR et al, 1998). Isso é demonstrado pelo co-transporte, GSH dependente, a partir da MRP1, de toxinas como a vincristina. Além disso, a MRP2 é

capaz de exportar GSH do interior de células transfectadas para o espaço extracelular (bile) de ratos (PAULUSMA et al, 1999). Outros estudos demonstraram que a MRP2 possui baixa afinidade pelo transporte de GSH, no entanto, como a concentração de GSH no fígado é muito alta (5-10mM), a MRP2 pode servir como importante mecanismo de manutenção do fluxo de substâncias dependes de GSH para a bile, bem como para o turnover hepático de GSH (PAULUSMA et al, 1999). Interessantemente, o transporte de GSH catalisado pela MRP3 não foi identificado (KOOL et al, 1999).

2.17 Função da MRP na Defesa contra o Estresse Oxidativo

Uma grande variedade de células e tecidos são capazes de liberar GSSG sob condições de adição de hidriperóxidos ou outros agentes causadores de estresse oxidativo indicando que as vias que envolvem a GSSG redutase podem ser insuficientes para prevenir os danos oxidativos (SIES et al, 1975 e 1988; AKERBOON et al, 1988; HOMOLYA et al, 2003). A identificação de proteínas liberadoras de GSSG das células, como a MRP1 e 2 (LEIR et al, 1996), sugerem que os membros da família das MRP`s sejam uma rota essencial para o controle intracelular dos níveis de GSSG e que as MRP`s medeiam o transporte de GSSG como um mecanismo adaptativo para compensar o estresse oxidativo quando a GSSG redutase torna-se a etapa limitante (ver figura 3). A liberação do conteúdo de GSSG é considerada um importante mecanismo de manutenção do potencial redox induzido pelos grupos tiols reduzidos. É consistente com esta visão que o estresse oxidativo aumente a expressão de MRP1 em cultura de células (YAMANE et al, 1998). Em astrócitos de ratos submetidos a estresse oxidativo, já foi verificado que a

bomba MRP1 medeia à liberação de GSSG em uma tentativa de defender-se contra os efeitos do estresse oxidativo, mantendo o estado redox inalterado (HIRRLINGER et al, 2001).

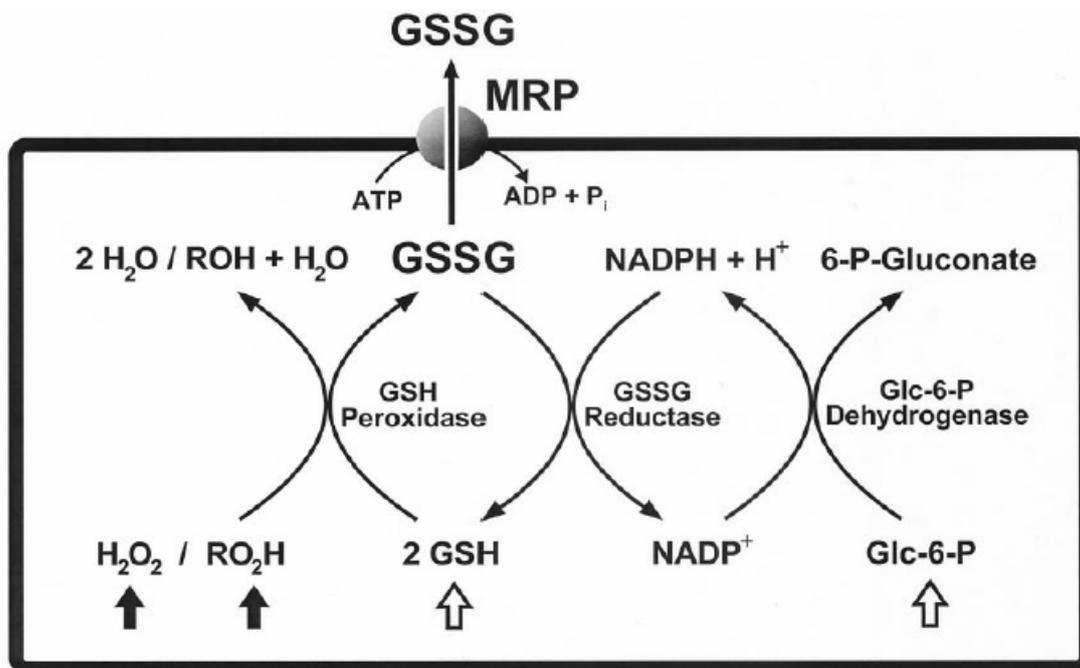


Figura 3. MRP1 e 2 mediando o transporte de GSSG quando este, causado pela saturação das vias da GSSG redutase, começa a acumular-se intracelularmente. Provável mecanismo de defesa contra os danos do estresse oxidativo. (SIES et al, 1988 e HOMOLYA et al, 2003).

2.18 Regulação dos genes de MRP por sinais de estresse

Atualmente sabe-se muito pouco a respeito das vias de sinalização que controlam a função e expressão das MRP's, tanto que as seqüências do promotor de seu gene ainda não foram identificadas. No entanto, as vias de regulação do gene da

MRP parece ocorrer através de estímulos de fatores externos. Sabe-se, por exemplo, que a irradiação gama em linhagens de células T humana causa aumento de até seis vezes os níveis do RNAm de mrp1 (OOSTHUIZEN et al, 2000; HARVIE et al, 1997).

Estudos recentes apontaram diversas ligações entre a atividade da p53 e a expressão de mrp1. A p53, aparentemente reduz a transcrição de mrp1 (VOLM et al, 1993) e em células mutantes com a p53 inativadas, os níveis de RNAm de mrp1 apresentam-se elevadas. A regulação negativa a partir da p53 parece ocorrer através de seus efeitos na transcrição de um ativador Sp-1 (WANG et al, 2000).

Contrariamente, um estudo recente indicou que a expressão de mrp1 em células cancerígenas de esôfago não é controlada por choque térmico (STEIN et al, 1997). No entanto, esta evidencia é limitada e novos estudos em diferentes linhas de células devem ser realizados.

Fatores inflamatórios demonstraram reduzir a atividade e a expressão de mrp2 ao nível do RNAm . Esta regulação a menor (“dowregulation”) parece ocorrer durante a liberação de citocinas inflamatórias, como já demonstrado em camundongos tratados com IL-6, IL-8 β e TNF- α . Além disso, agentes antiinflamatórios como a dexametasona previnem grandes mudanças na expressão de MRP2 induzidas pela inflamação (KUBITZ et al, 1999). Recentemente foi demonstrado que alterações no estado redox celular podem induzir o aumento da expressão de MRP1 e 2 (KAUFFMANN et al, 2002).

A resistência a drogas anticâncer em pacientes com câncer de próstata, é associada a mutações no gene da PTEN, uma fosfatase que participa na inativação da via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Aparentemente, o aumento da atividade da

PI3K leva a aumento da resistência a drogas anticâncer. Interessantemente, a expressão de MRP1 mas não de MDR1 é observada. Juntos, estes dados sugerem uma via de comunicação cruzada entre a PI3K e o controle gênico das MRP's (LEE et al, 2002).

Como mostrado acima, os mecanismos de regulação da expressão da MRP ainda são carentes de estudos e, até o momento sua relação com as perturbações do estado redox em exercício nunca foi abordada.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados 36 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) adultos (3-4 meses) machos. A opção por animais machos se deve ao fato de que o estrogênio, segundo Paroo et al. (1999), determina uma menor expressão de HSP70 em resposta ao exercício. Os animais, obtidos junto ao Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS, foram mantidos sob um ciclo de claro/escuro de 12/12 h e temperatura ambiente de 23 °C. Receberam, *ad libitum*, dieta comercial-padrão para ratos de laboratório contendo aproximadamente 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lípidos, e livre acesso à água de torneira.

3.2 Exercício

O protocolo de exercício compreendeu natação (60 minutos) em tanque contendo água a uma temperatura entre 29-30°C, a fim de evitar que a imersão em água fria amenize a elevação da temperatura que acompanha o exercício (FEHRENBACH and NIESS, 1999). Para evitar que o animal flutuasse foi fixado, à cauda, um peso correspondendo a 5% do peso corporal deste. A escolha desta carga é baseada no estudo de GOBATTO (2001) onde foi demonstrado que ratos Wistar sedentários submetidos a uma sessão de natação aguda, conseguem manter constantes os níveis de lactato sangüíneo sem causar o acúmulo deste (5,5mmol/l).

3.3 Treinamento

O treinamento foi composto de sessões diárias de natação (60 minutos), durante sete dias sem intervalos. Após a última sessão de treinamento, os animais foram sacrificados e os tecidos extraídos para análise.

3.4 Grupos experimentais:

Os animais, divididos em pares, foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos: Grupo exercício Agudo (nada 60min, sem treinamento); Grupo Controle agudo (mantido na água, sem nadar, pelo mesmo tempo do par que nada até o término da sessão). Grupo exercício treinado (uma semana) e controle treinado (mantido na água, sem nadar enquanto o grupo de treinamento nada). Após a última sessão de exercício os animais foram sacrificados e os músculos gastrocnêmio e coração serão cirurgicamente removidos e processados para análises.

3.5 Preparações e determinações bioquímicas realizadas:

- Obtenção e Preparação dos músculos (gastrocnêmio e coração)
- Determinação do Conteúdo Intracelular de GSH e GSSG
- SDS-PAGE e *Western blotting* para HSP70 e MRP1
- Cálculo das Concentrações de Proteínas nas Amostras Analisadas
- Medida da atividade da ATPase de GSH (Bomba GS-X) em membranas de músculo cardíaco e gastrocnêmio.

3.6 Determinação do conteúdo intracelular de GSH e GSSG

Para a determinação dos conteúdos intracelulares de glutathiona (GSH) e dissulfeto de glutathiona (glutathiona oxidada, GSSG), os tecidos (cerca de 10 mg) foram lavados duas vezes em PBS (4°C) e imediatamente rompidos e homogeneizados em 200 µl de ácido metafosfórico 5% (m/v) para análise cinético-espectrofotométrica pelo método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) e GSSG redutase (GSRd) de ANDERSON (1985). A rápida homogeneização das células e tecidos em meio ácido é um passo de extrema importância para a inativação das tiol-transferases e γ -glutamiltanspeptidases responsáveis pela transformação da GSH em outros derivados peptídicos, levando a subestimativas das concentrações reais do tripeptídeo. Além disso, a acidificação previne a auto-oxidação da GSH que ocorre rapidamente em pH superior a 7,0 (ANDERSON, 1985; AKERBOOM & SIES, 1981). Por outro lado, apesar de a auto-oxidação da GSH em GSSG em meio ácido ocorrer numa taxa mínima (0,1 a 0,2% por hora), pelo fato de as concentrações intracelulares de GSSG serem naturalmente muito baixas (menos de 1% da concentração de GSH), o processamento das amostras para dosagem de GSSG deve ser efetuado o mais rapidamente possível, a fim de evitar-se resultados falsamente superiores aos valores reais (AKERBOOM & SIES, 1981). Em preparações celulares frescas (macrófagos, linfócitos e hepatócitos), as células normalmente são submetidas à incubação com tampão de hemólise para a retirada de eritrócitos contaminantes, uma vez que eritrócitos, por apresentarem significativa atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo da GSH, podem

interferir nos resultados, mesmo quando em baixa densidade celular. Por isso, serão eliminados os eritrócitos das preparações musculares a serem ensaiadas.

A primeira parte do ensaio consiste na determinação do conteúdo de glutatona "total" (GSH + 2 GSSG), medido em equivalentes de GSH pelo método da reciclagem com DTNB que leva à oxidação estequiométrica da GSH em GSSG com formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e posterior restituição da GSH pela redução altamente específica com GSSG redutase (GSRd, EC 1.6.4.2) na presença de NADPH. A taxa de formação de TNB, proporcional à soma inicial de GSH e GSSG, é, então, monitorada a 412 nm ($\epsilon_{\text{TNB}} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Alternativamente, pode ser monitorada a taxa de consumo de NADPH a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ou fluorimetricamente (excitação a 366 nm/emissão de 400-3000 nm). O método empregado é bastante sensível, específico e reprodutível. Contudo, como a velocidade da reação depende não somente da concentração inicial de GSH + GSSG, mas, também, da atividade da GSRd, fatores que interfiram na atividade enzimática, levarão invariavelmente a falsos resultados. Por isso, além de ser utilizada sempre uma curva de calibração (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 nmol) com padrão de GSH precisamente preparado a cada ensaio, são efetuadas leituras de amostras com adição de padrão, sendo, normalmente, os resultados obtidos idênticos aos observados para as amostras separadamente. A incubação é iniciada pela adição de 700 μl de NADPH (concentração final 0,17 mM) e 100 μl de DTNB (final 1,26 mM), ambos em tampão fosfato de sódio 143 mM (pH 7,5), a cerca de 25 μl de amostra (em MPA 5%) num volume final 990 μl em cubeta de 1 cm de caminho óptico a 37°C, sendo registrada a absorbância a 412 nm em jaqueta termostatizada com aquisição

direta e processamento cinético automático (em espectrofotômetro Amersham-Pharmacia Ultrospec 2000, UK) até a estabilização das leituras (12 min). Em seguida, são adicionados 10 μ l de GSRd (atividade final na cubeta de 0,5 U/ml) sob agitação e as amostras são analisadas espectrofotometricamente a 412 nm por cerca de 20 min adicionais.

Antes da determinação do conteúdo de GSSG, alíquotas de 100 μ l das mesmas amostras ensaiadas para GSH "total" são retiradas para conjugação da GSH presente com N-etilmaleimida (NEM, Fluka) segundo metodologia descrita em AKERBOOM & SIES (1981). São adicionados, então, 35 μ l de NEM 200 mM (concentração final 50 mM) diretamente às amostras dissolvidas em MPA 5%. Depois, a mistura é neutralizada, cuidadosamente sob agitação, até pH 5,5 pela adição de 20 μ l de KOH 2 M em tampão de ácido piperazina-N,N'-bis-(etanossulfônico) (PIPES, Boehringer, pKa= 6,8 a 25°C, faixa de trabalho de 6,1 a 7,5) 0,3 M. A inclusão de PIPES, ou outros agentes tamponantes como MOPS (ácido morfolinopropanossulfônico), previne alcalinização local, durante a neutralização, o que levaria a auto-oxidação da GSH, favorecida em pHs maiores que 7,0. O excesso de NEM, que, em concentrações tão baixas quanto 10 μ M inibe o processo de dosagem da GSSG por reciclagem em até 30% é efetuado por extração com 500 μ l de acetato de etila 3 vezes, sendo o excesso de solvente evaporado em concentrador SpeedVac e por passagem em corrente de nitrogênio. Posteriormente, cerca de 25 μ l de amostra são ensaiados pelo método da reciclagem, como descrito para a GSH, exceto que as amostras são inicialmente incubadas com a GSRd por 5 min a 37°C, tendo sido monitorada a absorbância a 340 nm (consumo de NADPH) até a

estabilização. Depois, é adicionado o DTNB e as leituras a 412 nm (produção de TNB) são acompanhadas espectrofotometricamente conforme descrito acima. A diferença entre os valores obtidos para glutathiona "total" e 2 x GSSG fornece os valores dos conteúdos de GSH procurados ($GSH = GSH_{total} - 2 \times GSSG$).

3.7 Expressão de proteínas de choque térmico (HSP) e análises por SDS-PAGE.

Para a avaliação da indução da síntese de HSP nos modelos experimentais apresentados, quantidades iguais de proteínas foram carregadas em gel de poliacrilamida (a 10%) para eletroforese. Depois das corridas, foi analisada a indução de expressão de HSP por densitometria (VDS, Amersham) ou as amostras foram submetidas à transferência e *Western blotting* com identificação das HSP70 (72 e 74 kDa, componentes da principal subfamília de HSP), através do uso de anticorpos monoclonais de camundongo contra HSP70 humana.

Para cada amostra preparada, quantidades iguais de (cerca de 20 a 100 μ g, dependendo do tamanho do gel preparado) são separadas durante 18h (16h a 9mA/gel; 2h a 18mA/gel) à temperatura ambiente (25°C) por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Utiliza-se o sistema vertical Slab Gel BIO-RAD (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) e tampão de eletrodo constituído de Tris a 25 mM, glicina a 192 mM e SDS a 1% (v/v), pH 8,3, usando-se 1 cm de gel de entrada (empilhamento) a 4% (m/v) e gel de separação a 10% (m/v) em termos de acrilamida, para corridas em géis de 20 cm em tampão de amostra redutor constituído de Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol a 10% (v/v), SDS a 2% (v/v) e β -mercaptoetanol a 5%, conforme descrito em SANTORO *et al* (1989). Como marcador de peso

molecular, utiliza-se a mistura de padrões de proteínas frias (BIO-RAD), contendo miosina (200 kDa), fosforilase *b* (92,5 kDa), BSA (69 kDa), ovalbumina (46 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e lisozima (14 kDa). Depois das corridas, os géis são destacados das placas de suporte, sendo os géis de entrada removidos.

Os géis contendo amostras não destinadas a immunoblot são corados sob agitação contínua com solução de Azul Comassie Brilhante (BIO-RAD) durante 20 min e submetidos à descoloração com agitação por cerca de 2 h em solução de ácido acético glacial a 5% até que sejam evidenciados os padrões de peso molecular (ainda fortemente corados contra o fundo já parcialmente descorado dos géis). Os géis são, então, transferidos para filtro de papel Whatman 3MM, envoltos em película de PVC e secos a 80°C por 2 h em um BIO-RAD Gel Dryer a vácuo programável.

As amostras contidas em géis destinados a processamento por *Western blotting*, como descrito em ELIA & SANTORO (1994), são transferidas diretamente para membranas de nitrocelulose (Millipore) em sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 70 V até um total de 150 V x h. Após a transferência, as bandas, contendo proteínas, são evidenciadas pela coloração com Vermelho Ponceaus, sal de sódio (Sigma) a 0,3% (m/v) em solução de TCA a 3%. Após a verificação, as membranas são descoradas em tampão TEN (Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM). Antes do "immunoblotting", os filtros de nitrocelulose são hibridizados com BSA a 1% (m/v) em água a fim de recobrirem-se as porções da membrana onde não houve transferência de proteínas, promovendo-se, então, bloqueio de ligação inespecífica dos anticorpos ao filtro. Para o *Western blotting* das HSP70, as membranas são incubadas à temperatura ambiente durante 18 h sob agitação enérgica em tampão

TEN-Tween 20 a 0,05% (v/v) na presença de anticorpo monoclonal 3A3 de camundongo contra HSP70 humana (Amersham), diluído a 1:1000, que reage especificamente com o polipeptídeo de 74 kDa, HSP74 (ou HSC70, proteína constitutiva) e com o de 72 kDa, HSP70 (ou HSP70 induzível). Depois disso, os filtros são lavados três vezes sob agitação por 10 min com 5 ml de TEN-Tween e incubados por 1 h com 5 ml de solução contendo o segundo anticorpo, IgG RPN 1177 (de cabra, contra imunoglobulinas de camundongo, biotilado, Amersham) em TEN-Tween sob agitação. Depois disso, repete-se a lavagem dos filtros, como descrito acima e os filtros são submetidos à reação com o conjugado streptavidin-horseradish peroxidase (Amersham) sob agitação por 1 h adicional. Após nova lavagem, as membranas são submetidas à reação com o revelador 4-Cl-Naftol (BIO-RAD) em tampão contendo NaCl 83 mM, Tris-HCl 17 mM, pH 7,4 e H₂O₂ a 0,15%. Imediatamente após o aparecimento das manchas de interesse com boa resolução, os filtros são retirados do revelador, lavados com água a fim de evitar-se superexposição e submetidos à secagem em estufa por 30 min a 37°C. Conforme a necessidade em cada caso, as manchas são fotografadas e levadas ao VDS Amersham Pharmacia para a aquisição de dados e armazenamento para tratamento e análises estatísticas posteriores.

3.8 Expressão de MRP1 e análises por SDS-PAGE.

Foi utilizada a mesma técnica da análise de HSP70 por SDS-PAGE, utilizando-se apenas de diferentes anticorpos (moclonais anti-MRP1 humana)

3.9 Cálculo das concentrações de proteínas nas amostras analisadas

Na determinação das concentrações de proteínas nas amostras, quando demandado em cada caso, são utilizados os métodos de BRADFORD (1976) e de LOWRY *et al* (1951), conforme indicado. Em ambas as determinações, são utilizadas como padrão de referência, soluções de albumina sérica bovina (BSA) fração V (Sigma). A razão para a escolha de um ou outro método é a sensibilidade e interferência de certos componentes das preparações a serem analisadas. O método de BRADFORD, baseado na ligação do Azul Comassie Brilhante G-250 0,01% (m/v) em meio de ácido fosfórico 8,5% (m/v)-etanol 4,7% (m/v) a proteínas das amostras, com formação de complexo que absorve intensamente a 595 nm (BIO-RAD Protein Assay kit, Bio-Rad Laboratories, GmbH, DR), apresenta, na faixa de algumas dezenas de microgramas de proteína ensaiada, sensibilidade um pouco maior que o método de LOWRY *et al*. Este, por sua vez, baseia-se na ligação do reagente de Folin-Ciocalteu a hidroxilas fenólicas presentes em amostras protéicas hidrolisadas previamente em meio alcalino, com formação de complexo cromogênico que pode ser monitorado espectrofotometricamente a 750 nm. Por outro lado, em amostras contendo dodecilsulfato de sódio (SDS), EDTA, EGTA, sacarose, Triton X-100 e Tris, devido à razoável interferência apresentada, optou-se pela utilização do método de LOWRY *et al*.

3.10 Medida da atividade da ATPase de GSH (Bomba GS-X) em membranas de músculo cardíaco e gastrocnêmio

Este protocolo foi desenvolvido em nosso laboratório (Kolberg et al, 2005) para avaliarmos a capacidade de exportação de S-conjugados de GSH, pelas membranas das células estudadas, independentemente de outros fatores intracelulares como concentração de GSH e atividade GST. Neste ensaio foi acoplada a hidrólise de ATP, estimulada por conjugados de GSH (DNPSG sintetizado, como descrito acima, e GSSG), ao consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), em presença de fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH).

Os tecidos foram homogeneizados manualmente com tampão de extração em uma proporção de 5ml/g de tecido. Foi utilizado um homogeneizador manual de vidro (tipo Potter-Elvehjem), adicionada solução de fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF, inibidor de serino-proteases do tipo quimotripsina, tripsina e trombina, bem como de cisteíno-proteases como papaína) 100 μ M, e leupeptina (inibidor de serino-proteases e tiol-proteases, como tripsina, plasmina, proteinase K, calicreína, papaína, trombina e catepsina A e B) a 2 μ g/ml, e homogeneizado.

Seguiu centrifugação a 1000 x g por 10 min para a separação de restos celulares, núcleos e células inteiras. O sobrenadante foi reservado e o precipitado ressuspenso em presença de PMSF 100 μ M e leupeptina a 2 μ g/ml. Em seguida, foi adicionado tampão de extração, e somados os sobrenadantes que, a seguir, foram centrifugados a 15.000 x g por 20 min para a remoção da fração mitocondrial. Descartado o precipitado, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 15.000 x g

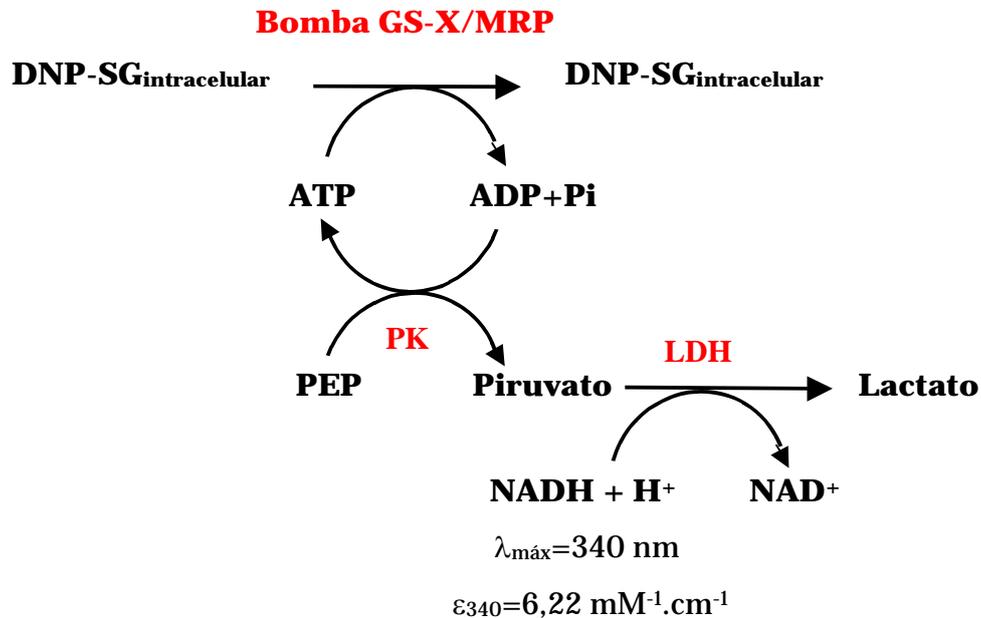
por 10 min para a exclusão eventuais mitocôndrias remanescentes. Novamente, foi descartado o precipitado e o sobrenadante centrifugado a 100.000 x *g* por 1 hora para a obtenção da fração microssomal (de membranas). Descartado o sobrenadante (fração solúvel), o precipitado (microssomos) foi homogeneizado em homogeneizador manual de vidro (tipo Potter-Elvehjem) em 5 volumes de tampão de extração, e centrifugado a 15.000 x *g* por 20 min para uma nova lavagem das mitocôndrias contaminantes. Descartado o precipitado, o sobrenadante foi centrifugado novamente a 100.000 x *g* por 1 hora para a purificação da fração microssomal. Depois, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado novamente homogeneizado em homogeneizador manual de vidro (tipo Potter-Elvehjem) em tampão Tris-Lubrol (veja a seguir, por favor) e centrifugado a 100.000 x *g* por 1 hora. Esta etapa foi realizada porque a bomba GS-X pode ser solubilizada em lubrol PX (um detergente composto de condensados de óxido de etileno com álcoois graxos normalmente utilizado para a remoção e solubilização de certas proteínas de membrana, como adenilil ciclase). Após a centrifugação, o precipitado do Tris-lubrol foi descartado e o sobrenadante (contendo a atividade enzimática a ser testada) foi reservado para ser ensaiado.

Optou-se por utilizar o detergente lubrol e não Triton-X100, pois, em experimentos prévios, observamos que o Triton interfere muito na determinação espectrofotométrica da enzima, provavelmente por inativar a lactato desidrogenase e/ou a piruvato quinase utilizadas.

O princípio da técnica desenvolvida em nosso laboratório baseia-se na monitoração espectrofotométrica da hidrólise de ATP acoplada ao consumo de

NADH na presença de amostras de membranas, e do sistema fosfoeno/piruvato, piruvato quinase e lactato desidrogenase (veja esquema abaixo).

PRINCÍPIO



onde

DNP-SG = 2,4-dinitrofenil-S-glutationa

ATP = adenosina, trifosfato

ADP = adenosina, difosfato

Pi = fosfato inorgânico

PK = piruvato quinase

LDH = lactato desidrogenase

PEP = fosfoeno/piruvato

NAD⁺/NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo forma oxidada/reduzida

Descrição do ensaio: O ADP formado pela hidrólise do ATP na presença da ATPase e dos substratos (GSSG ou DNP-SG) é fosforilado pela piruvato quinase (PK, Boehringer) na presença de fosfoeno/piruvato (PEP, Sigma, que funciona como doador do grupo fosfato), que também é adicionado à cubeta de reação. Desfosforilado, o PEP transforma-se em piruvato que, por sua vez, é reduzido a lactato na presença de NADH (Sigma, adicionado à cubeta) e da enzima lactato desidrogenase (LDH, Sigma). Como o consumo de NADH é estequiométrico com a hidrólise de ATP pela ATPase/Bomba GS-X, esta técnica permite avaliar a atividade de bomba, monitorando o consumo de NADH a 340 nm na presença de GS-conjugados.

Escolha do substrato: DNP-SG é um substrato mais sensível às várias isoformas das bombas GS-X/MRP ($K_m < 100 \mu\text{M}$). No entanto, o referido substrato é colorido e absorve fortemente a 340 nm, inviabilizando qualquer determinação espectrofotométrica nesta faixa de comprimento de onda. A alternativa mais comum é a utilização de DNP-SG triciado. Entretanto, além de o uso de radioativos ser sempre motivo de atenção redobrada e, sempre que possível, substituído por outra técnica, à contagem do substrato captado por transporte ativo pelas vesículas só pode ser feito *a posteriori*. A presente técnica tem o diferencial de permitir a determinação de atividade da bomba GS-X *online*. No entanto, outro substrato “incolor” deve ser utilizado. No caso presente, foi utilizado o próprio GSSG, substrato fisiológico da ATPase e que não absorve a 340 nm. Apesar de a sensibilidade das ATPase ao GSSG ser menor ($K_m > 1 \text{ mM}$) o dissulfeto de glutathiona apresentou

perfis cinéticos idênticos aos observados quando o substrato era o DNP-SG. A única restrição com relação do GSSG é que, por tratar-se de substância fortemente oxidante (em termos bioquímicos) com $E_0 = + 1,26 \text{ V}$, não pode ser adicionado ao meio de incubação em concentrações superiores a **4 mM**, para evitar-se a oxidação instantânea do NADH ($E_0 = - 0,3 \text{ V}$).

ENSAIO ESPECTROFOTOMÉTRICO

- 700 μl de tampão de ensaio Tris-Sacarose (TrisHCl 10 mM, pH 7,4, sacarose 250 mM)
- 50 μl de NADH 4 mM (final 200 μM)
- 50 μl de MgCl_2 200 mM (final 10 mM)
- 50 μl de PEP 40 mM (final 2 mM)
- 50 μl de ATP 20 mM (final 1 mM)
- 50 μl de mistura de enzimas PK/LDH (20 U/ml de cada = final 1 U/ml de cada)
- até 30 μl de membranas solubilizadas
- 10 μl de inibidores (ouabaína, EGTA etc.)
- 10 μl de DNP-SG 10 mM (final 100 μM) para o início da corrida

monitora-se o consumo de NADH a 340 nm e 37°C

CÁLCULOS:

$\epsilon_{\text{NADH}/340 \text{ nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ logo, $6,22 (\mu\text{mol/ml})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Sendo as cubetas de 1 cm de caminho óptico, e o volume final sempre mantido em 1 ml, podemos dizer que $\epsilon_{\text{NADH}/340 \text{ nm}} = 6,22$ por μmol de ATP hidrolisado na unidade de tempo. Sendo os valores obtidos por volta de três ordens de grandeza menores que μmols , podemos escrever:

$\text{nmols de ATP} = \text{variação da absorbância} / 0,00622$

ou em termos cinéticos:

$\text{nmols de ATP/min/mg proteína} = (\text{variação da absorbância/min}) / 0,00622 \times \text{mg proteína}$.

3.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Os resultados de cada grupo foram avaliados através de teste "t" de Student pareado. Foi utilizado o teste de análise de variância complementado com o teste de comparações múltiplas de Student-Newmann-Keus. As diferenças foram consideradas significativas para um nível de significância de, pelo menos, 5%.

RESULTADOS

4.1 Metabolismo da glutaciona no miocárdio de ratos submetidos ao exercício agudo de natação

Os resultados a seguir são apresentados em nmols/g de tecido nas variantes de dissulfeto de glutaciona (GSSG), glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona total, enquanto a relação GSSG/GSH é representada em unidades arbitrárias.

As variações no conteúdo de GSSG, GSH e a relação GSSG/GSH no miocárdio entre os grupos controle e exercício agudo não apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,05$) como se pode observar nas tabela 2 e nas figuras 4, 5 e 6.

GRUPOS	AMOSTRA	GSH TOTAL	GSSG	GSH	GSSG/GSH
EXERCÍCIO	X1	4986.47	471.08	4044.31	0.1165
	X2	4766.92	504.34	3758.24	0.1342
	X3	3680.68	314.54	3051.60	0.1031
	X4	4664.37	762.37	3139.63	0.2428
CTRL	X5	3895.03	405.20	3084.63	0.1314
	X6	3815.25	701.86	2411.53	0.2910
	X7	5382.80	439.74	4503.32	0.0976
	X8	3850.04	466.90	2916.24	0.1601

GRUPOS	GSH		GSSG		GSSG/GSH		GSH TOTAL	
	média	Desvio Pa	média	Desvio Pa	média	Desvio Pa	média	Desvio Pa
EXERCÍCIO	3498.45	340.07	513.08	131.28	0.149	0.045	4524.610	409.019
CTRL	3228.93	633.88	503.43	95.23	0.170	0.060	4214.695	541.203

Tabela 2. Metabolismo da Glutaciona no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%.

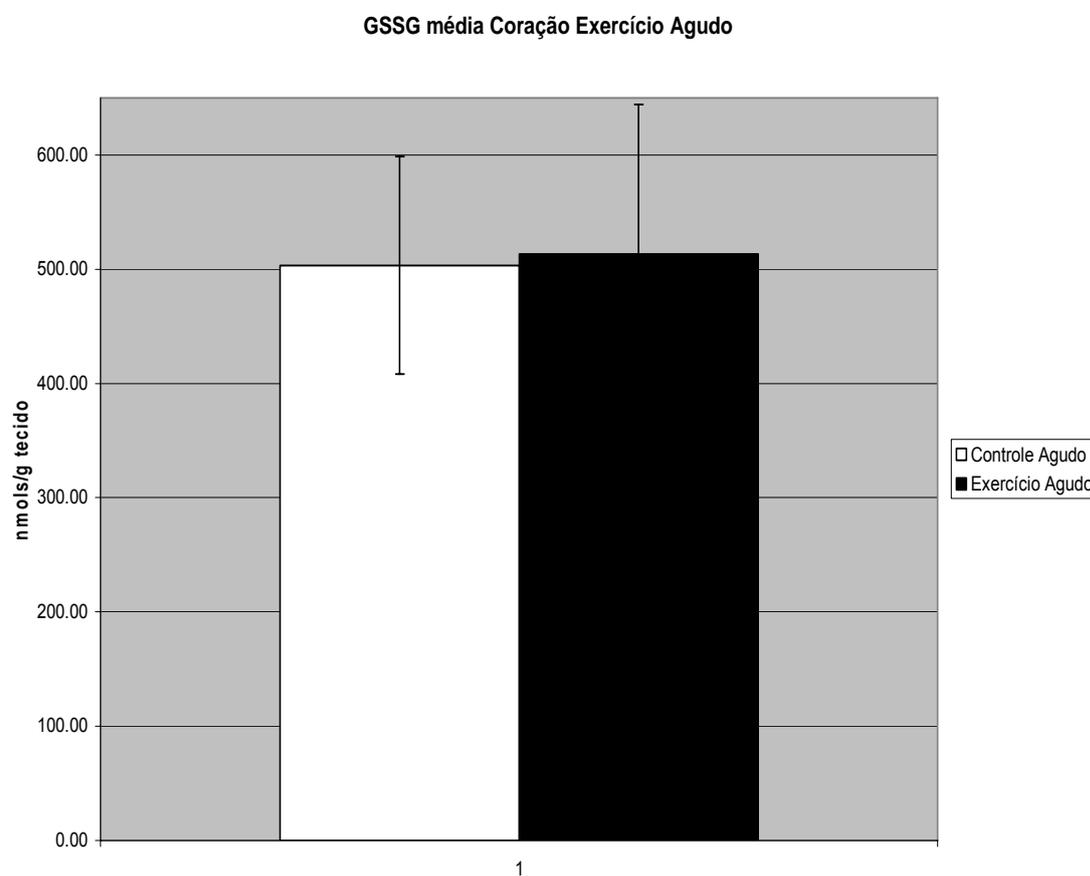


Figura 4. Conteúdo de dissulfeto de glutathiona no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo de natação. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%.

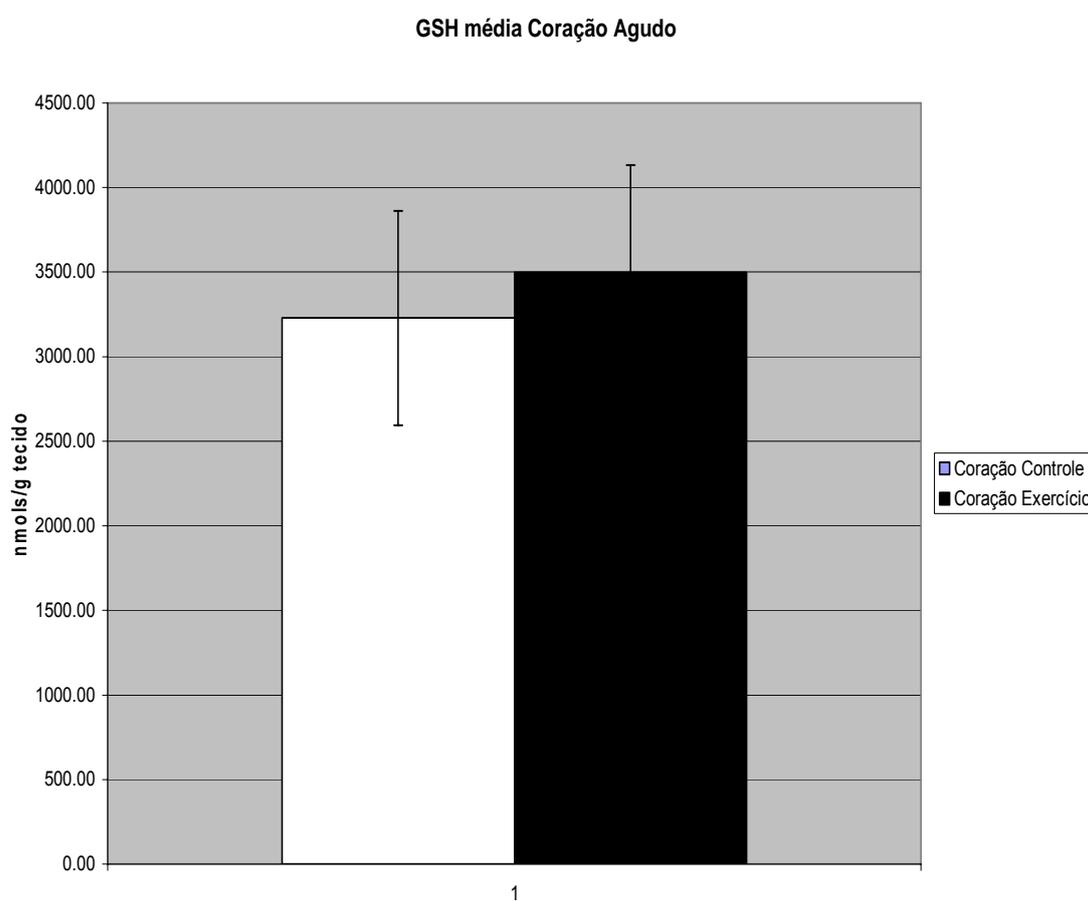


Figura 5. Conteúdo de glutathiona reduzida no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo de natação. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%.

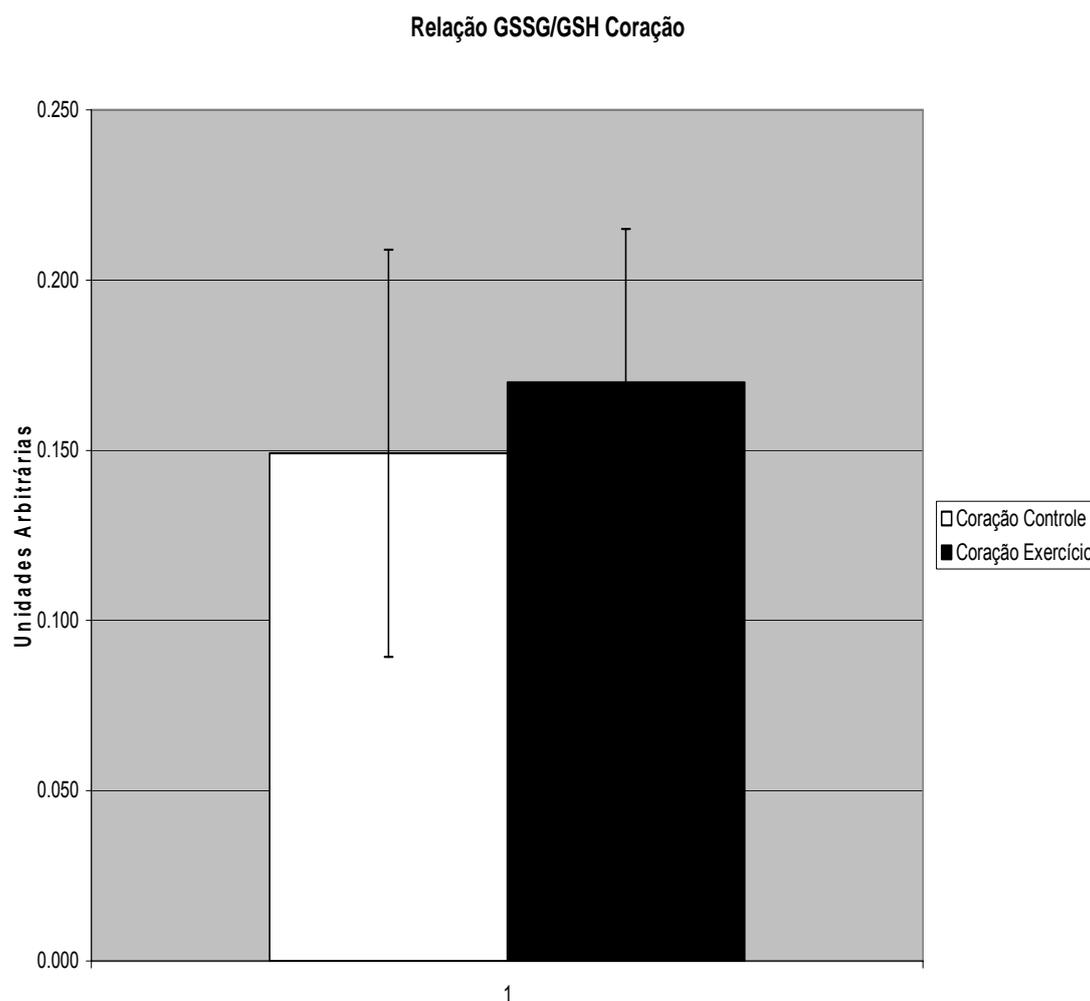


Figura 6. Relação média de GSSG/GSH no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo de natação. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%.

4.2 Metabolismo da glutatona no miocárdio de ratos submetidos ao exercício agudo após treinamento de natação

Os resultados a seguir são apresentados em nmols/g de tecido nas variantes de dissulfeto de glutatona (GSSG), glutatona reduzida (GSH) e glutatona total, enquanto a relação GSSG/GSH é representada em unidades arbitrárias.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os conteúdos de GSH no miocárdio dos grupos estudados. No entanto, o grupo exercício treinado apresentou uma redução significativa de 29% no conteúdo de dissulfeto de glutatona com relação ao seu grupo controle. O estado redox, verificado pela relação GSSG/GSH permaneceu inalterado entre os grupos.

GRUPOS	AMOSTRA	GSH TOTAL	GSSG	GSH	GSSG/GSH
EXERCÍCIO	X1	8,908	680	7547.54	0.0902
	X2	5,756	845	4065.08	0.2079
	X3	4,707	1,057	2593.23	0.4075
CTRL	X4	7,490	1,231	5027.40	0.2449
	X5	5,608	1,089	4423.20	0.1941
	X6	6,601	1,334	3933.00	0.3391

GRUPOS	GSH		GSSG		GSSG/GSH		GSH TOTAL	
	média	Desvio Pa	média	Desvio Pa	média	Desvio Pa	média	Desvio Pa
EXERCÍCIO	4735.28	1799.05	860.81	133.37	0.235	0.113	6456.910	1546.355
CTRL	4461.20	387.63	1217.90	87.04	0.259	0.052	6566.267	665.508

Tabela 3. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Metabolismo da Glutatona no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo após treinamento de natação.

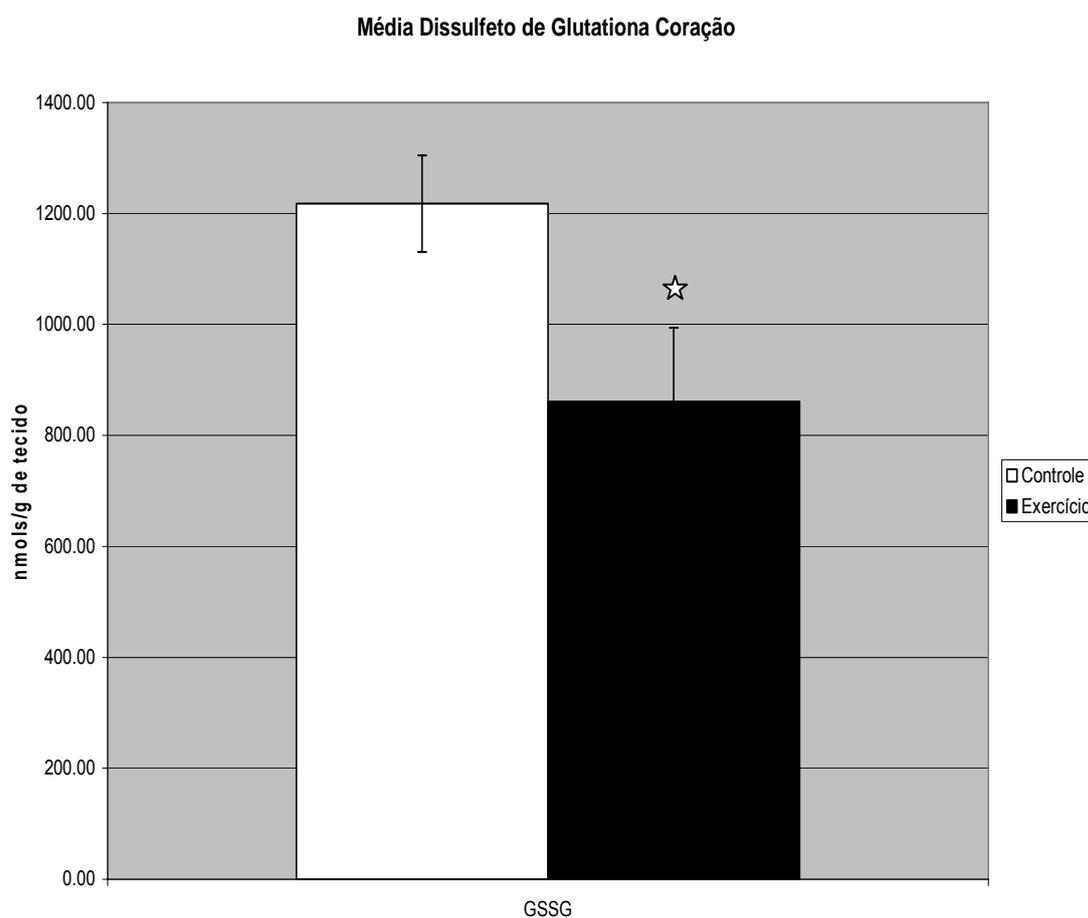


Figura 7. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Conteúdo de dissulfeto de glutathiona no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo de natação após treinamento. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

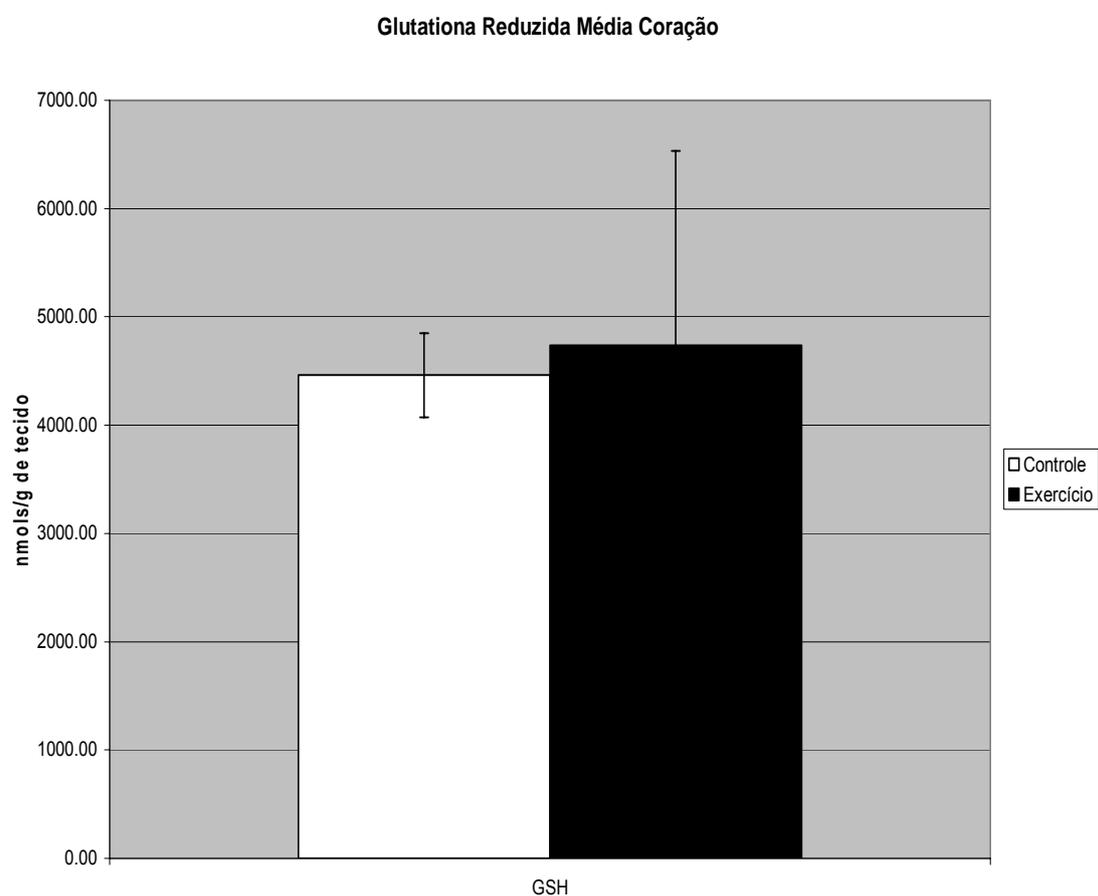


Figura 8. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Conteúdo de glutathiona reduzida no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo de natação após treinamento. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

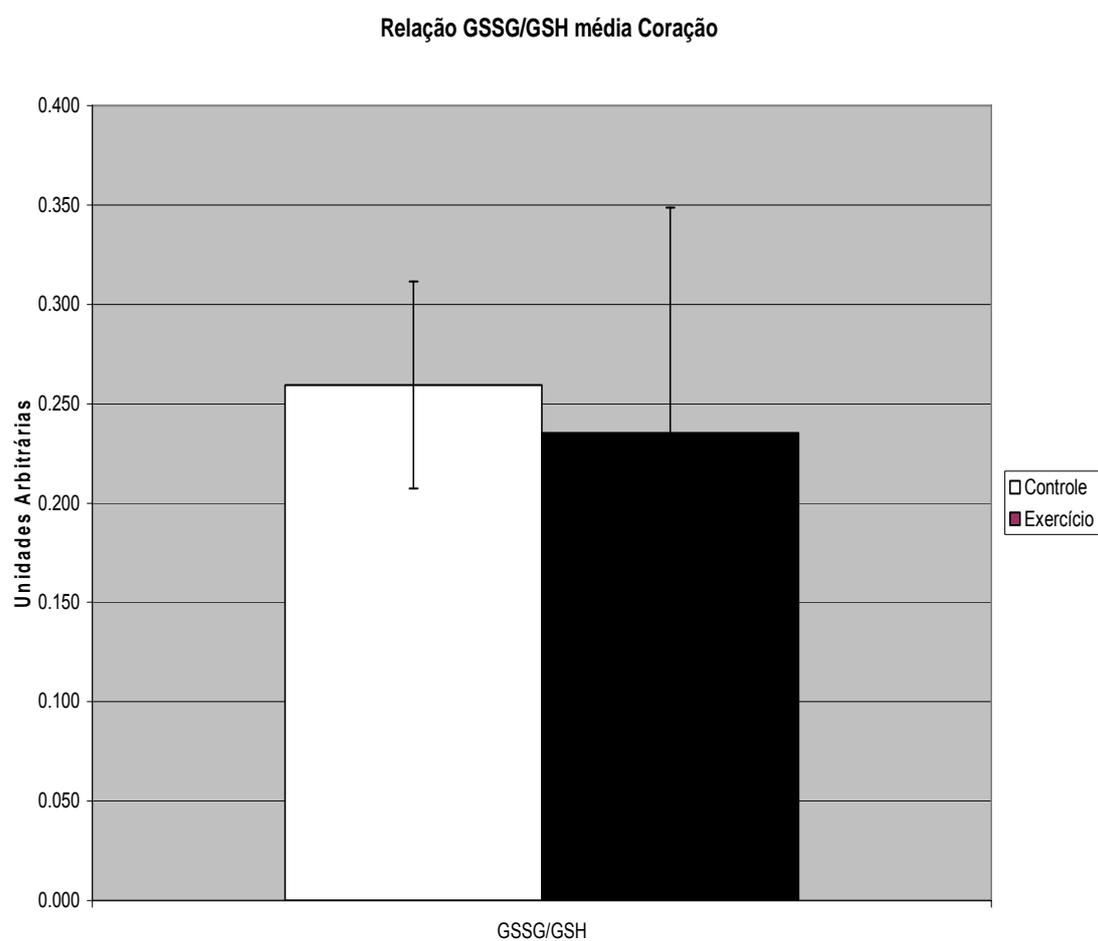


Figura 9. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Relação média de GSSG/GSH no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico agudo de natação após treinamento. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média., $p < 0,05$.

4.3 Variações no metabolismo da glutathione no miocárdio entre animais submetidos ao exercício agudo e treinados uma semana.

Repetindo os resultados anteriormente demonstrados, aqui comparamos o comportamento das variáveis envolvidas no metabolismo da glutathione entre os grupos controle do exercício agudo, exercício agudo não treinado, controle repouso de uma semana e exercício agudo treinado por uma semana.

Os resultados a seguir são apresentados em nmols/g de tecido nas variantes de dissulfeto de glutathione (GSSG), glutathione reduzida (GSH) e glutathione total, enquanto a relação GSSG/GSH é representada em unidades arbitrárias.

Com relação ao conteúdo de glutathione reduzida no miocárdio, só foram encontradas diferenças significativas entre os grupos controle agudo e controle treinado (27%) e entre o grupo exercício agudo e controle treinado (21%) como se observa na figura 10.

As concentrações de dissulfeto de glutathione médio no miocárdio foram significativamente maiores no grupo controle treinado com relação aos grupos controle agudo (58%), exercício agudo (57%) e exercício treinado (29%). O grupo exercício treinado apresentou aumento de GSSG quando comparados aos grupos controle agudo (41%) e exercício agudo (40%); como se observa na figura 11.

Quando o estado redox celular foi avaliado pela relação GSSG/GSH, verificou-se que este permanecia inalterado, com exceção de uma diferença entre o estado redox dos grupos exercício agudo e exercício treinado (42% maior no segundo).

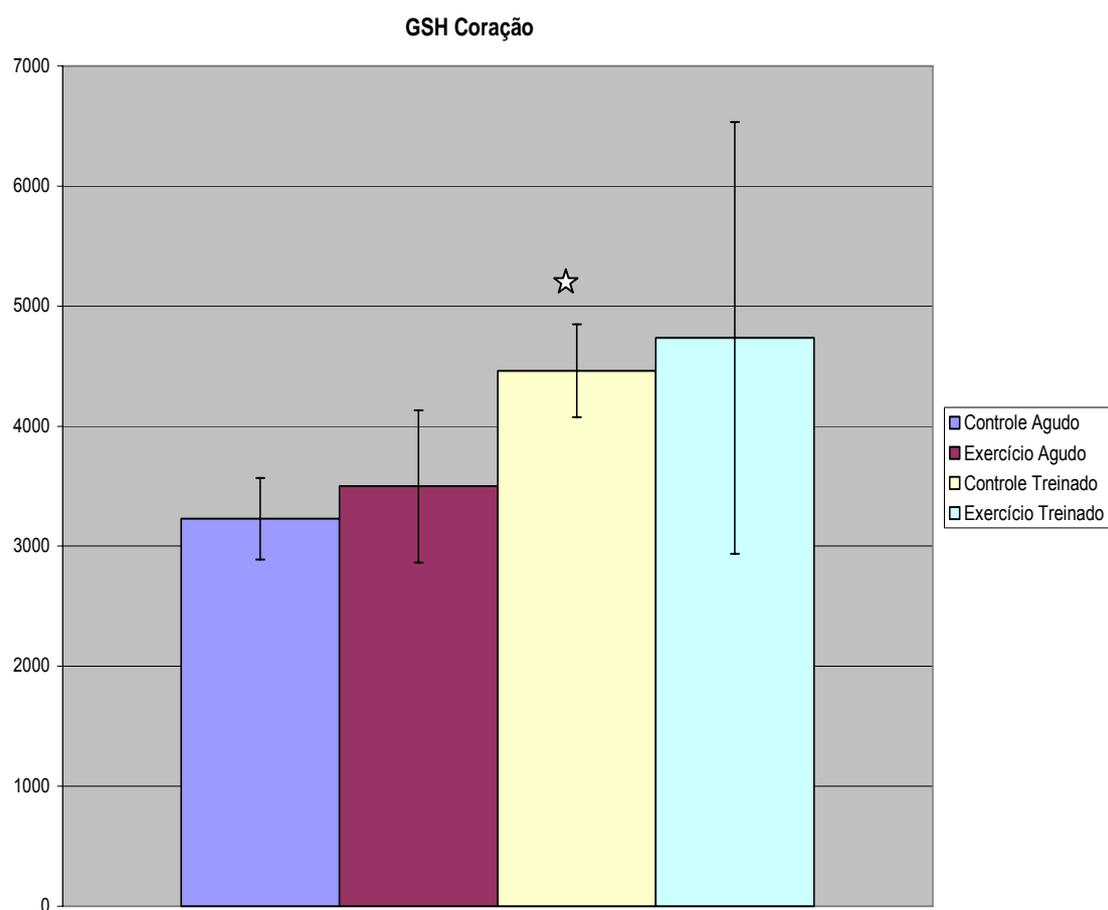


Figura 10. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Conteúdo médio de glutathiona reduzida no miocárdio. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

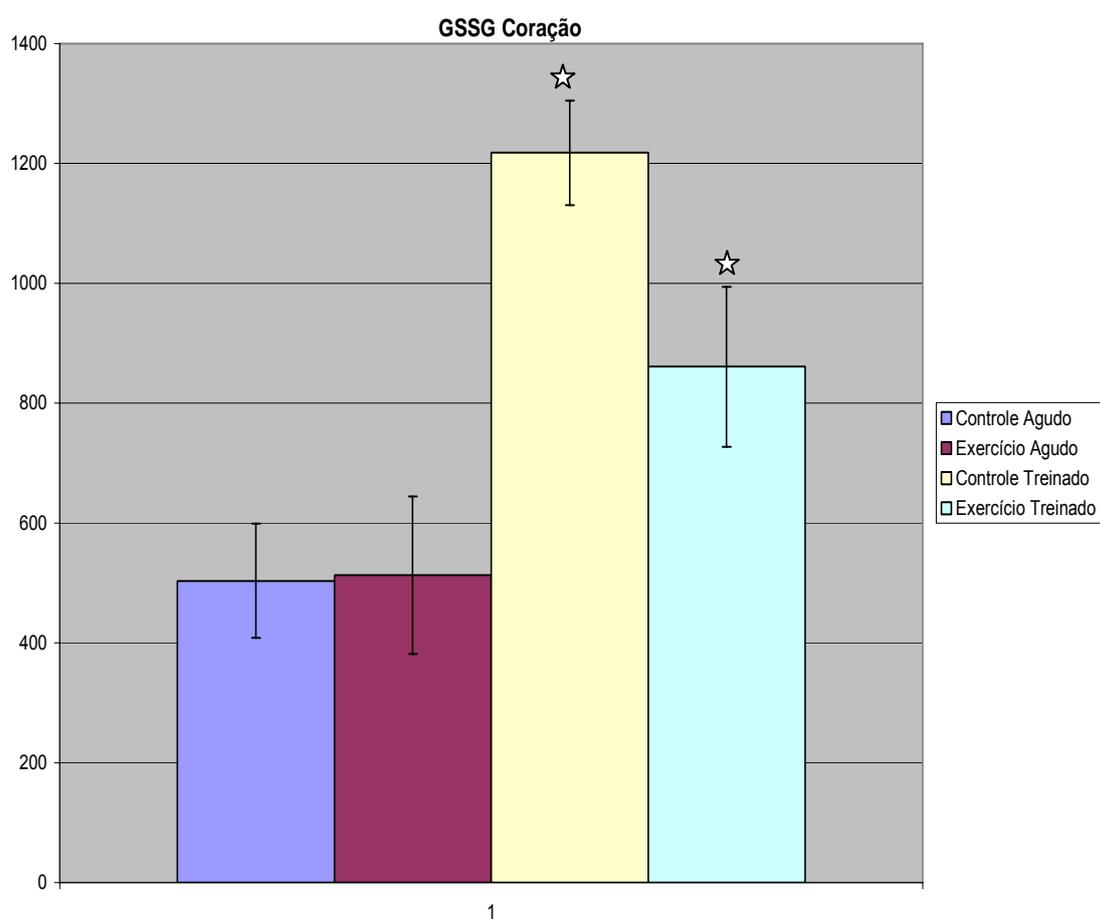


Figura 11. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Conteúdo médio de dissulfeto de glutathiona no miocárdio. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

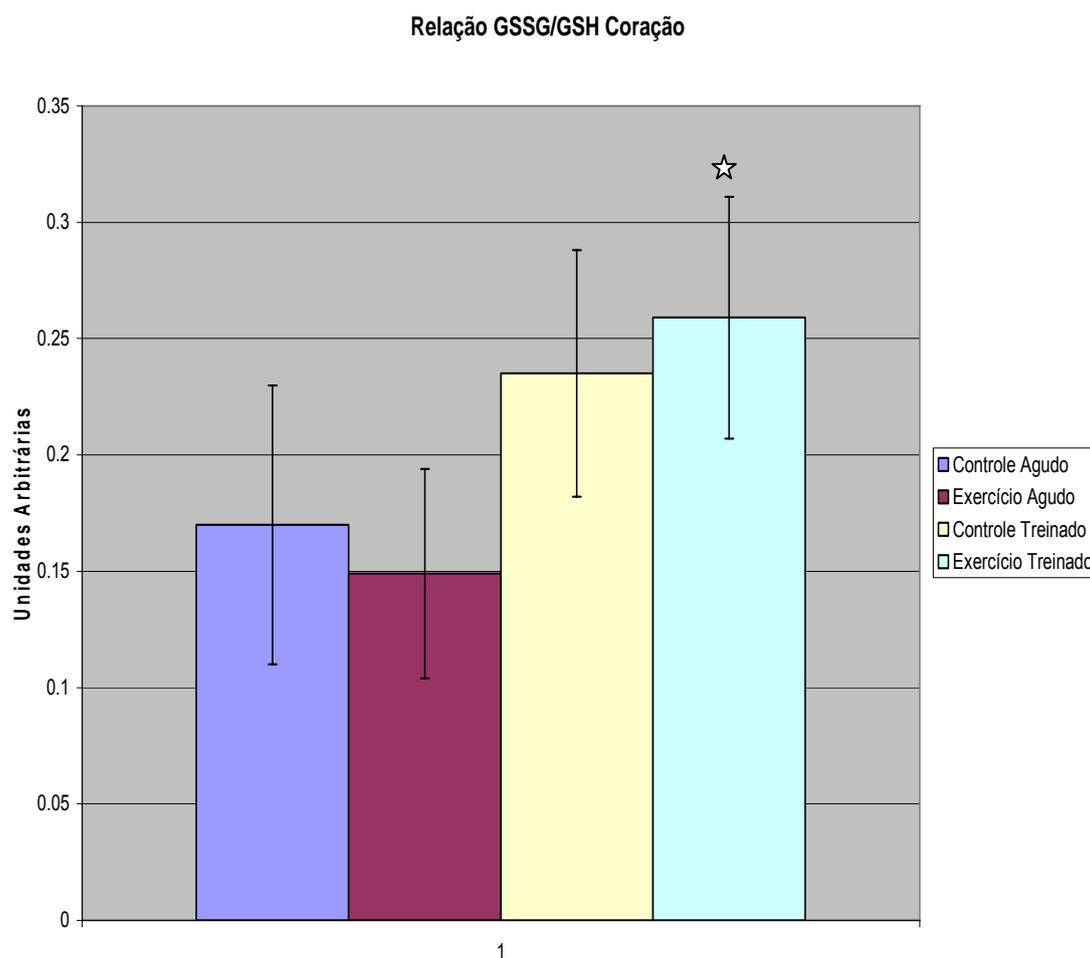


Figura 12. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Relação média de GSSG/GSH no miocárdio. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

4.4 Metabolismo da glutatona no gastrocnêmio de ratos submetidos ao exercício agudo de natação

Os resultados a seguir são apresentados em nmols/g de tecido nas variantes de dissulfeto de glutatona (GSSG), glutatona reduzida (GSH) e glutatona total, enquanto a relação GSSG/GSH é representada em unidades arbitrárias. Os resultados obtidos nesta modalidade podem ser vistos na tabela 4.

GRUPOS	AMOSTRA	GSH TOTAL	GSSG	GSH	GSSG/GSH
EXERCÍCIO	X1	10,746	2,723	5298.70	0.5140
	X2	11,206	2,217	6771.18	0.3274
	X3	9,002	2,540	3921.31	0.6478
CTRL	X4	13,099	1,511	10077.38	0.1499
	X5	13,858	905	14352.13	0.0653
	X6	16,163	1,151	13860.85	0.0830

GRUPOS	GSH		GSSG		GSSG/GSH		GSH TOTAL	
	média	Desvio Pa	média	Desvio Pa	média	Desvio Pa	média	Desvio Pa
EXERCÍCIO	5330.40	1007.77	2493.58	181.23	0.496	0.114	10317.563	822.162
CTRL	12763.45	1654.02	1189.04	215.28	0.099	0.032	14373.107	1128.373

Tabela 4. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Metabolismo da Glutatona no gastrocnêmio de ratos submetidos a exercício físico agudo, $p < 0,05$.

Com relação ao conteúdo intracelular de dissulfeto de glutathiona, os animais sedentários que foram submetidos ao exercício físico agudo apresentaram um aumento significativo de 52% quando comparados com o seu respectivo grupo controle, como é observado na figura 13.

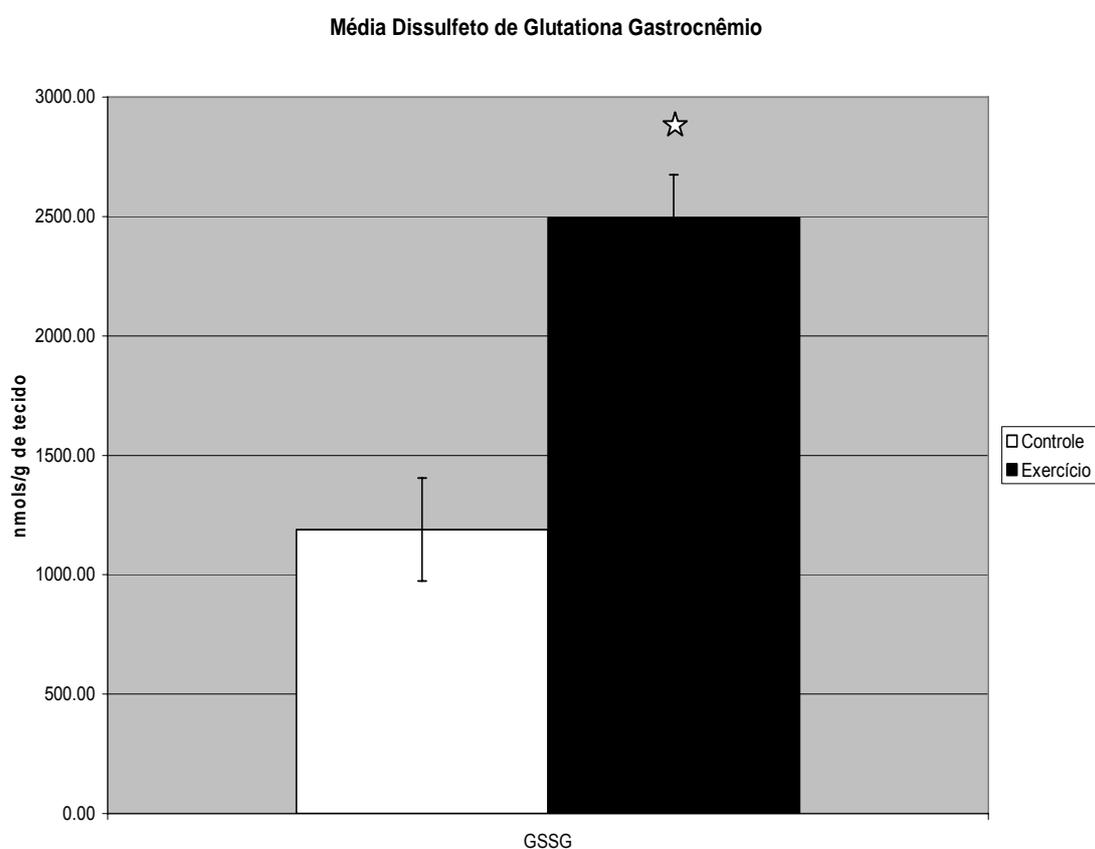


Figura 13. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Conteúdo médio de GSSG no gastrocnêmio de ratos submetidos a exercício agudo de natação. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

Como mostra a figura 14, a concentração de glutathiona reduzida no gastrocnêmio dos animais exercitados encontra-se diminuída em 58% em relação ao grupo controle.

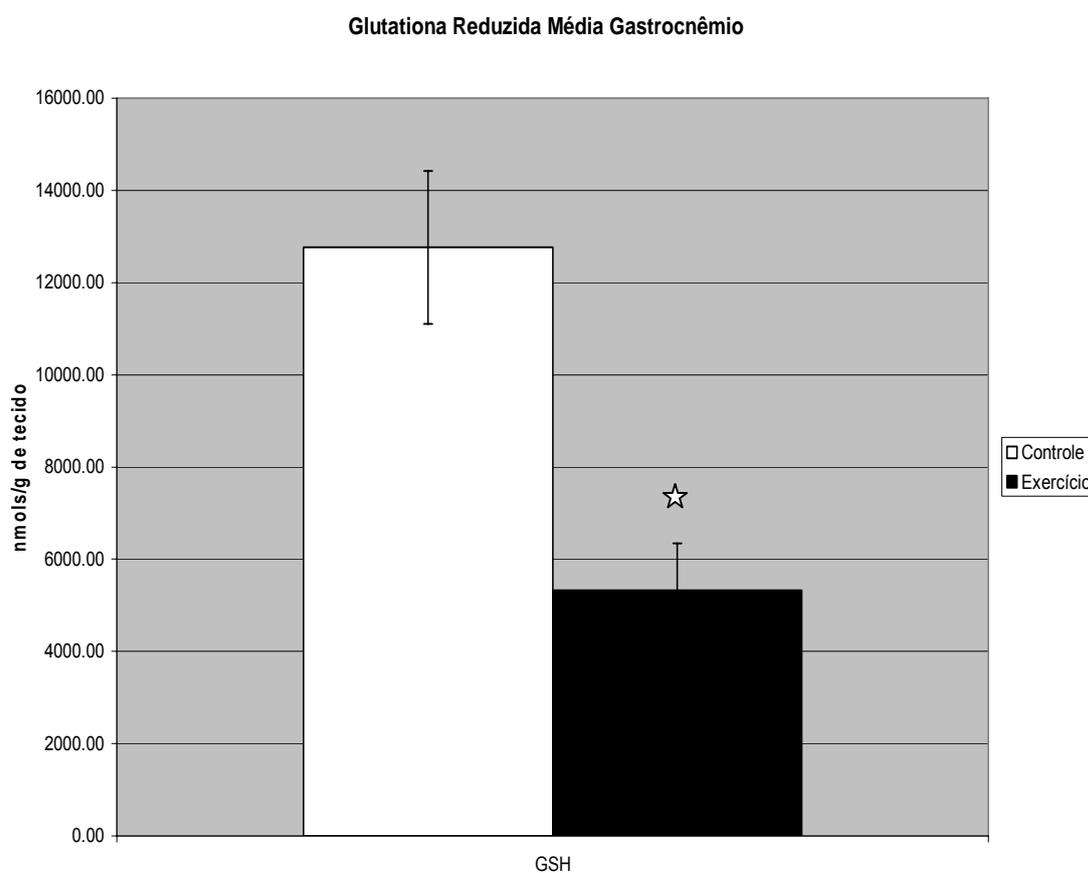


Figura 14. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Conteúdo médio de glutathiona reduzida no gastrocnêmio de animais sedentários submetidos ao exercício agudo de natação. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

O estado redox, medido pela relação GSSG/GSH no gastrocnêmio do grupo exercício foi 80% maior que no grupo controle, indicando a presença de estresse oxidativo conforme a figura 15.

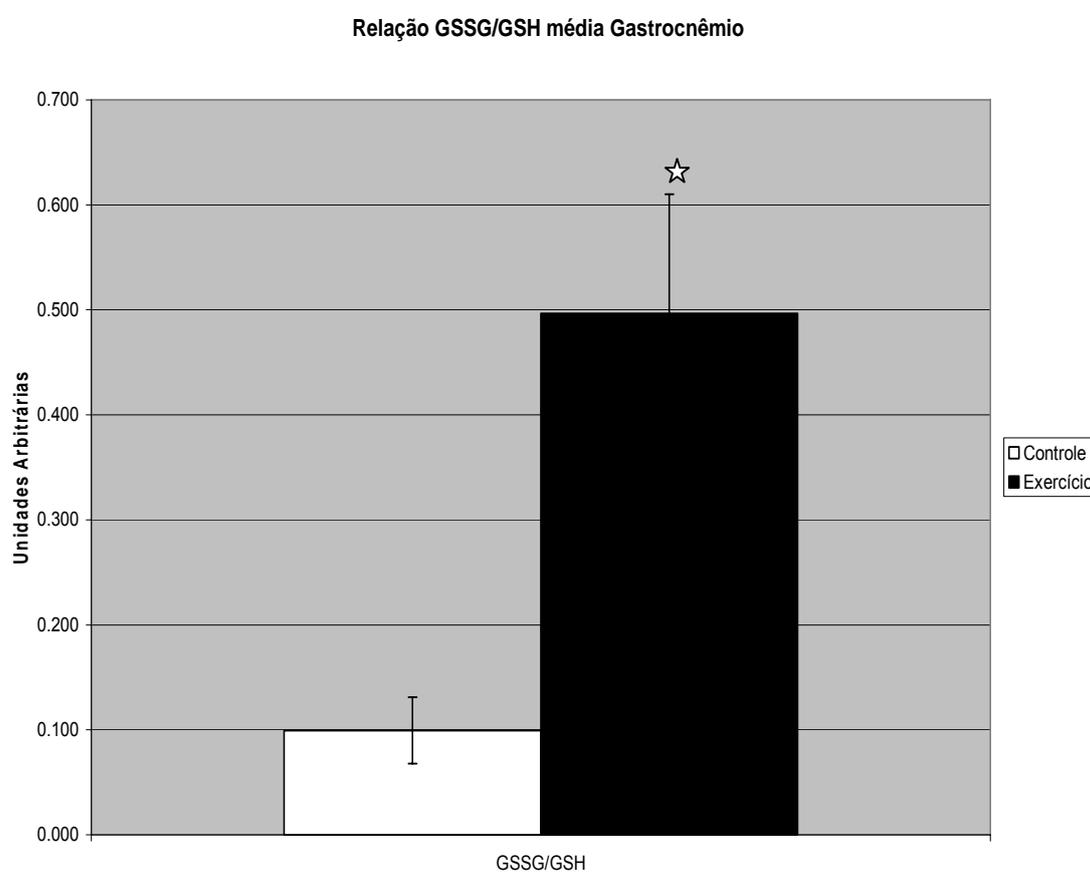


Figura 15. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Relação GSSG/GSH média no gastrocnêmio de ratos submetidos ao exercício agudo de natação. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

4.5 Metabolismo da glutaciona no gastrocnêmio de ratos submetidos ao exercício agudo após treinamento de natação

Os resultados a seguir são apresentados em nmols/g de tecido nas variantes de dissulfeto de glutaciona (GSSG), glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona total, enquanto a relação GSSG/GSH é representada em unidades arbitrárias. Os resultados obtidos nesta modalidade podem ser vistos na tabela 5.

GRUPOS	AMOSTRA	GSH TOTAL	GSSG	GSH	GSSG/GSH
EXERCÍCIO	X1	4,664	2,001	662.26	3.0210
	X2	4,269	1,910	450.30	4.2405
	X3	4,058	1,807	444.60	4.0641
CTRL	X4	5,962	1,436	3089.40	0.4649
	X5	3,876	1,841	1311.00	0.4750
	X6	4,993	998	2998.20	0.3327

GRUPOS	GSH		GSSG		GSSG/GSH		GSH TOTAL	
	média	Desv. Pad	média	Desv. Pad	média	Desv. Pad	média	Desv. Pad
EXERCÍCIO	519.05	87.72	1905.70	68.56	3.775	0.466	4330.453	217.244
CTRL	2466.20	708.15	1425.00	298.34	0.424	0.056	4943.800	738.203

Tabela 5. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Metabolismo da Glutaciona no gastrocnêmio de ratos submetidos a exercício físico agudo após treinamento de natação, $p < 0,05$.

O conteúdo de GSH reduzida no gastrocnêmio do grupo treinado foi 78% menor do que em seu respectivo controle. (figura 16), enquanto que a sua concentração de dissulfeto de glutaciona foi 29% maior que no grupo controle (figura 17).

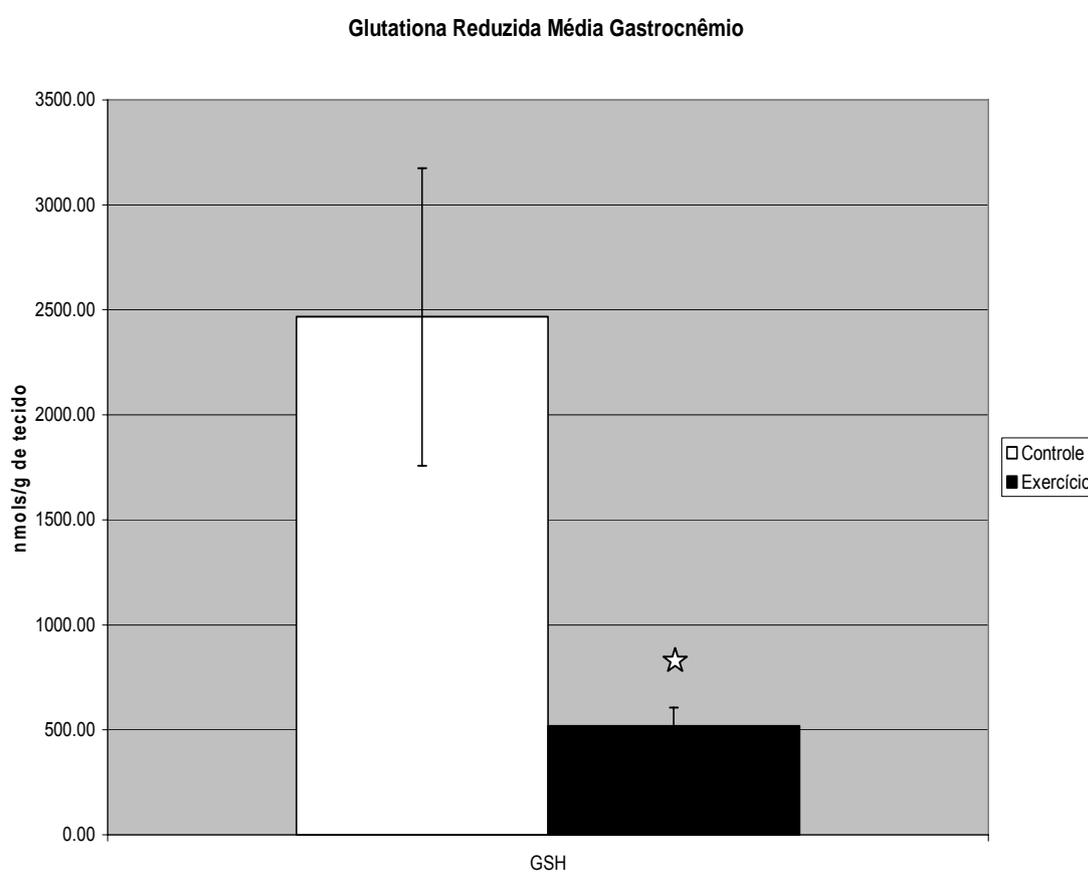


Figura 16. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Conteúdo médio de glutaciona reduzida no gastrocnêmio de animais treinados submetidos ao exercício agudo de natação. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

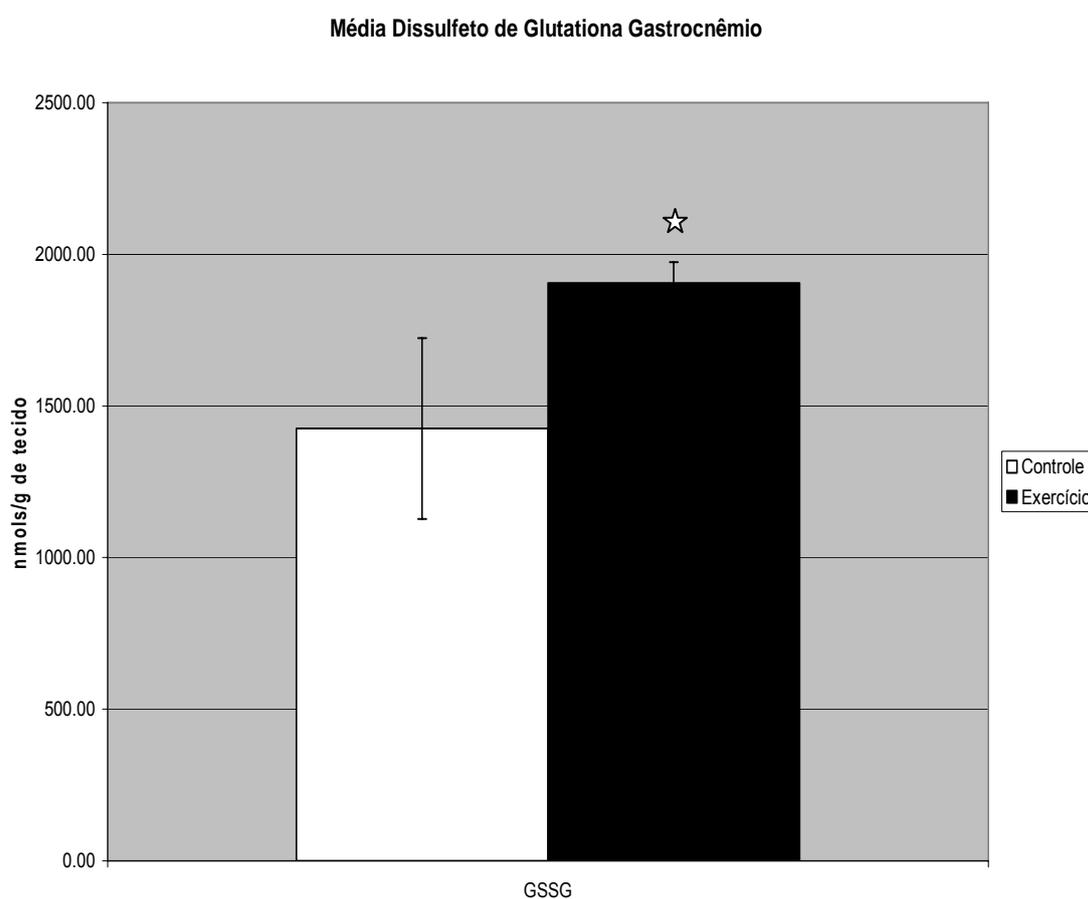


Figura 17. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Conteúdo médio de glutaciona oxidada no gastrocnêmio de animais treinados submetidos ao exercício agudo de natação. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

A relação GSSG/GSH no gastrocnêmio do grupo exercício treinado, foi 88% maior do que em seu respectivo controle. Como demonstrado na figura 18.

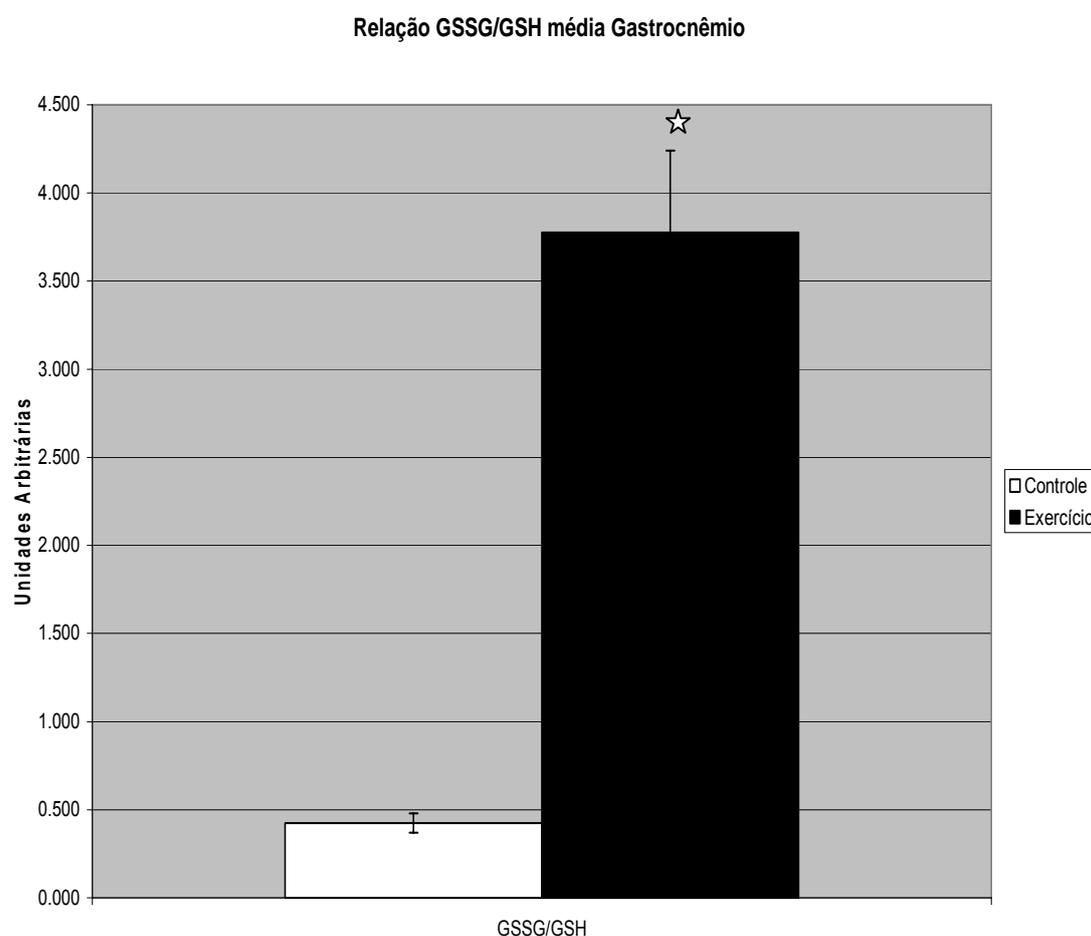


Figura 18. . Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Relação GSSG/GSH média no gastrocnêmio de ratos treinados submetidos ao exercício agudo de natação. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

4.6 Variações no metabolismo da glutathione no gastrocnêmio entre animais submetidos ao exercício agudo e treinados uma semana.

Repetindo os resultados anteriormente demonstrados, aqui comparamos o comportamento das variáveis envolvidas no metabolismo da glutathione entre os grupos controle do exercício agudo, exercício agudo não treinado, controle repouso de uma semana e exercício agudo treinado por uma semana.

Os resultados a seguir são apresentados em nmols/g de tecido nas variantes de dissulfeto de glutathione (GSSG), glutathione reduzida (GSH) e glutathione total, enquanto a relação GSSG/GSH é representada em unidades arbitrárias.

Com relação ao conteúdo de GSH reduzida foram encontradas diferenças entre todos os grupos. O grupo controle agudo diferiu positivamente em 58% do grupo exercício agudo, 80% do grupo controle treinado e 95% grupo exercício treinado. O grupo agudo treinado obteve diferença significativa de 53% maior que no grupo controle treinado e de 90% com o grupo exercício treinado. Como citado anteriormente, houve também diferença de 78% entre o controle treinado e o exercício treinado.

O grupo controle agudo apresentou diferença estatística significativa, em relação ao seu conteúdo de glutathione oxidada, de 37% comparado com o grupo exercício treinado e 52% com relação ao controle treinado. O grupo exercício treinado apresentou seu conteúdo de GSSG 25% maior que seu controle e 23% maior quando comparado com o grupo exercício agudo. Houve também diferença de 42% entre os grupos exercício agudo e controle treinado.

Na avaliação do estado redox (GSSG/GSH), o grupo controle agudo foi diferente em 80% , 14% e 97% quando comparado respectivamente aos grupos exercício agudo, treinado controle e exercício treinado. Entre os grupos treinado controle e exercício treinado houve diferença de 88% e entre o exercício treinado e exercício agudo de 49%. Estas diferenças tornam-se mais claras quando observadas nas figuras 19, 20 e 21.

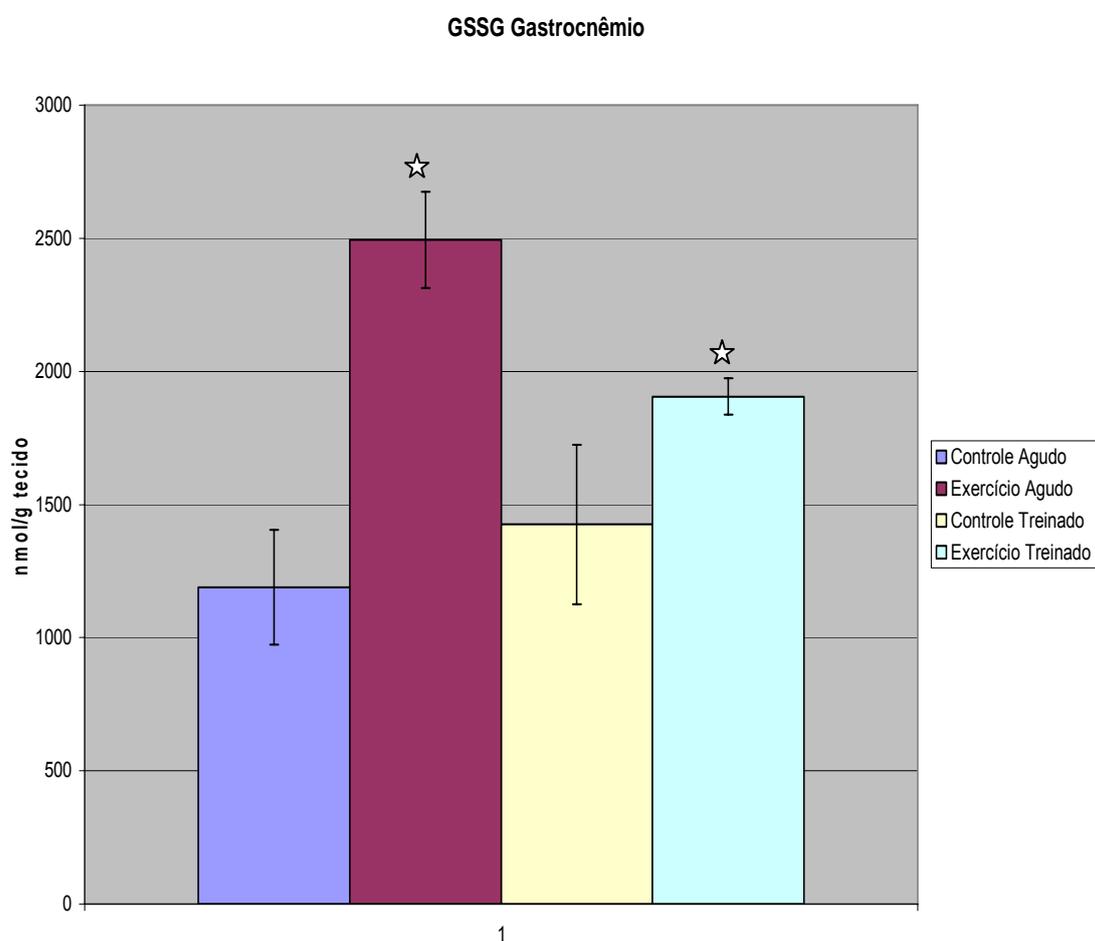


Figura 19. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Conteúdo médio de dissulfeto de glutatona no

gastrocnêmio. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

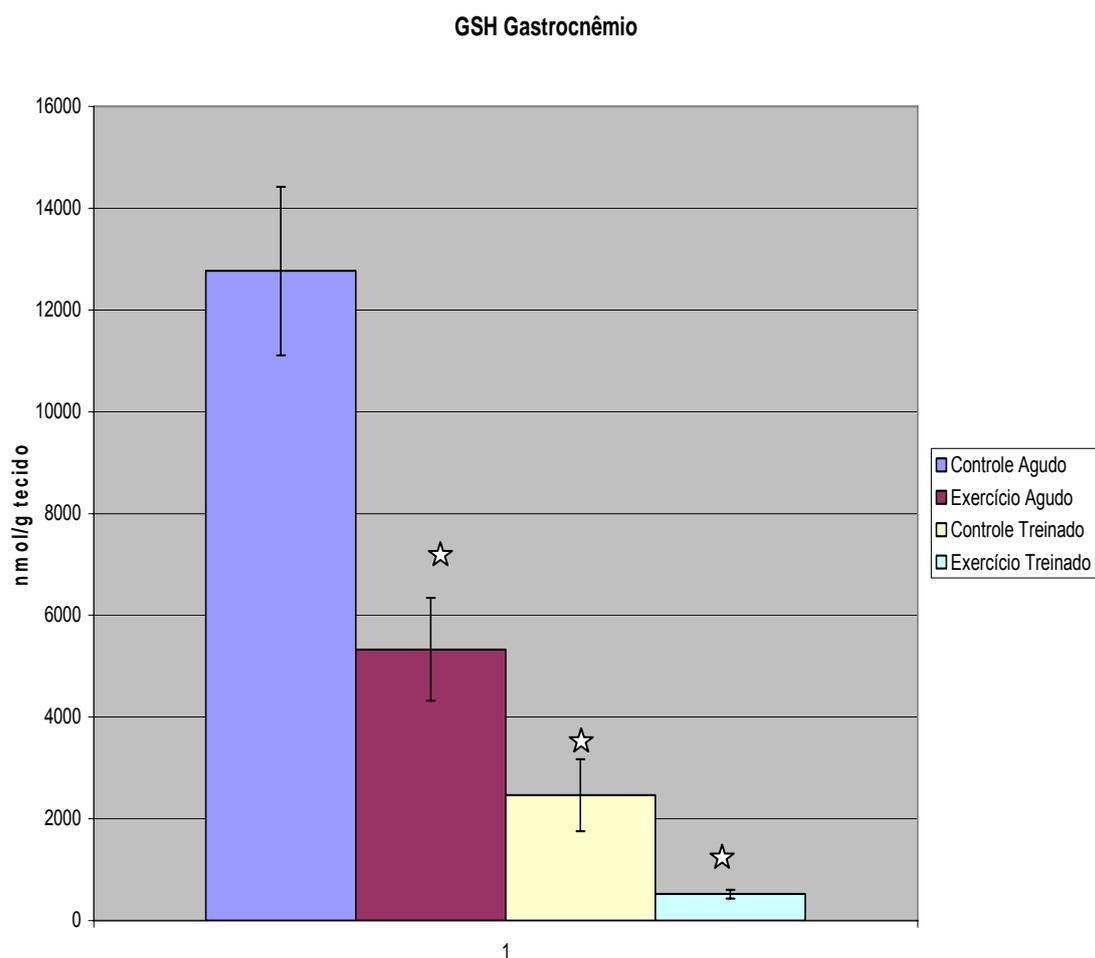


Figura 20. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Conteúdo médio de glutathiona reduzida no gastrocnêmio. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

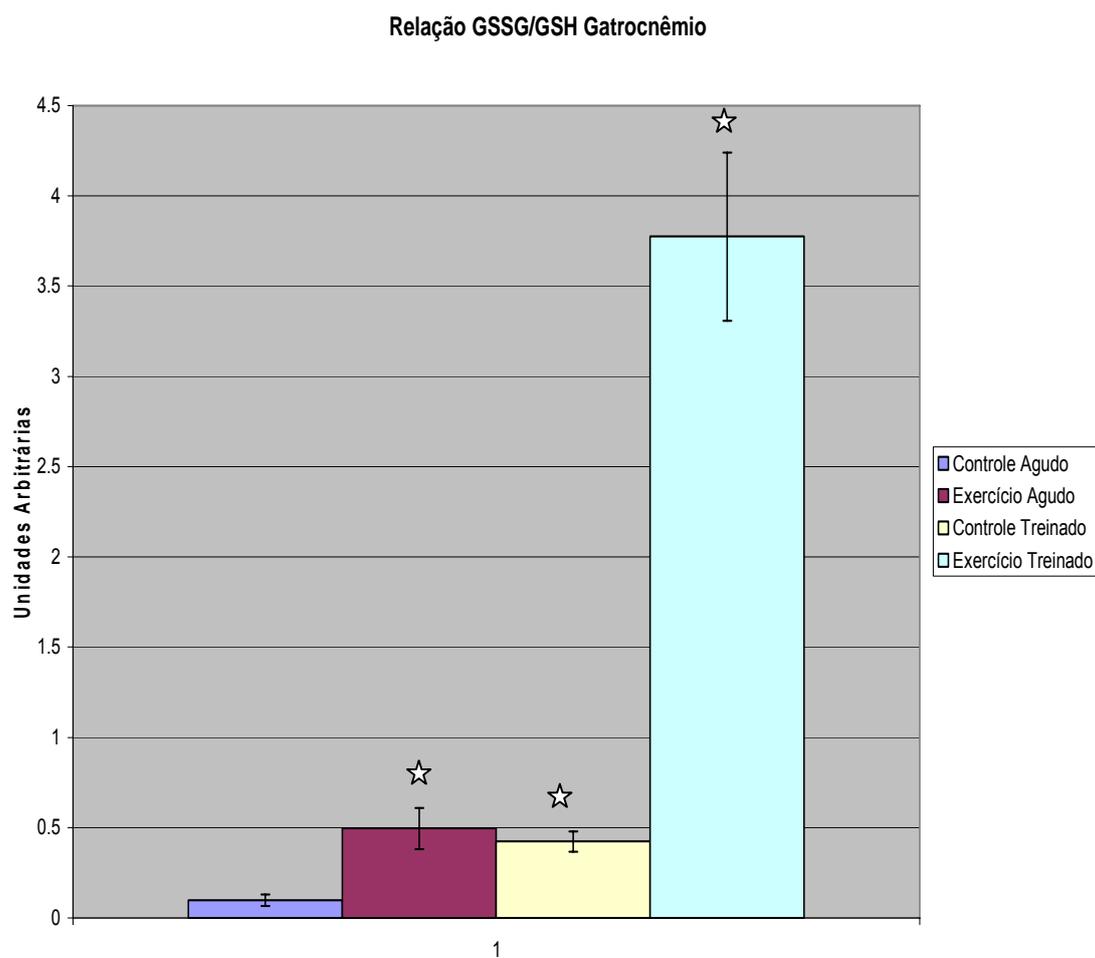


Figura 21. Animais imediatamente sacrificados após o exercício e tecidos homogeneizados em MPA a 5%. Relação média de GSSG/GSH no gastrocnêmio. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

4.7 Atividade da Bomba MRP1/GS-x no gastrocnêmio e miocárdio de ratos treinados submetidos a exercício agudo de natação.

A tabela 6 apresenta os dados obtidos a partir dos ensaios bioquímicos realizados para identificar a atividade enzimática da bomba MRP1. O SLOPE indica a velocidade de transporte em UI/min. O resultado final da velocidade é expresso em nmol/min/mg de proteína.

CORAÇÃO					
ANIMAL	SLOPE MÉDIO (descontando GSSG)	VELOCIDADE MÉDIA (VM)		VALOR FINAL DA VM	
		MÉDIA		DESVPAD	EPM
R1	0,0122	144.70	145.23	8.85	5.11
R2	0,0128	154.34			
R3	0,0117	136.66			
R4	0,0165	213.02	201.04	10.39	6.00
R5	0,0154	195.56			
R6	0,0153	194.54			
GASTROCNÊMIO					
ANIMAL	SLOPE MÉDIO (descontando GSSG)	VELOCIDADE MÉDIA (VM)		VALOR FINAL DA VM	
		MÉDIA		DESVPAD	EPM
R1	0,0134	163.99	164.52	2.45	1.42
R2	0,0133	162.38			
R3	0,0136	167.20			
R4	0,0136	167.20	165.60	7.37	4.25
R5	0,0139	172.03			
R6	0,0130	157.56			

Tabela 6. Atividade da bomba MRP1/GS-x no gastrocnêmio e miocárdio de ratos treinados submetidos a exercício agudo de natação.

Os dados obtidos demonstraram que o miocárdio apresenta 21,4% mais atividade GS-x quando comparado ao gastrocnêmio. Como pode ser observada nas figuras 22 e 23, a atividade GS-x é alterada com o treinamento, porém a do gastrocnêmio permanece inalterada.

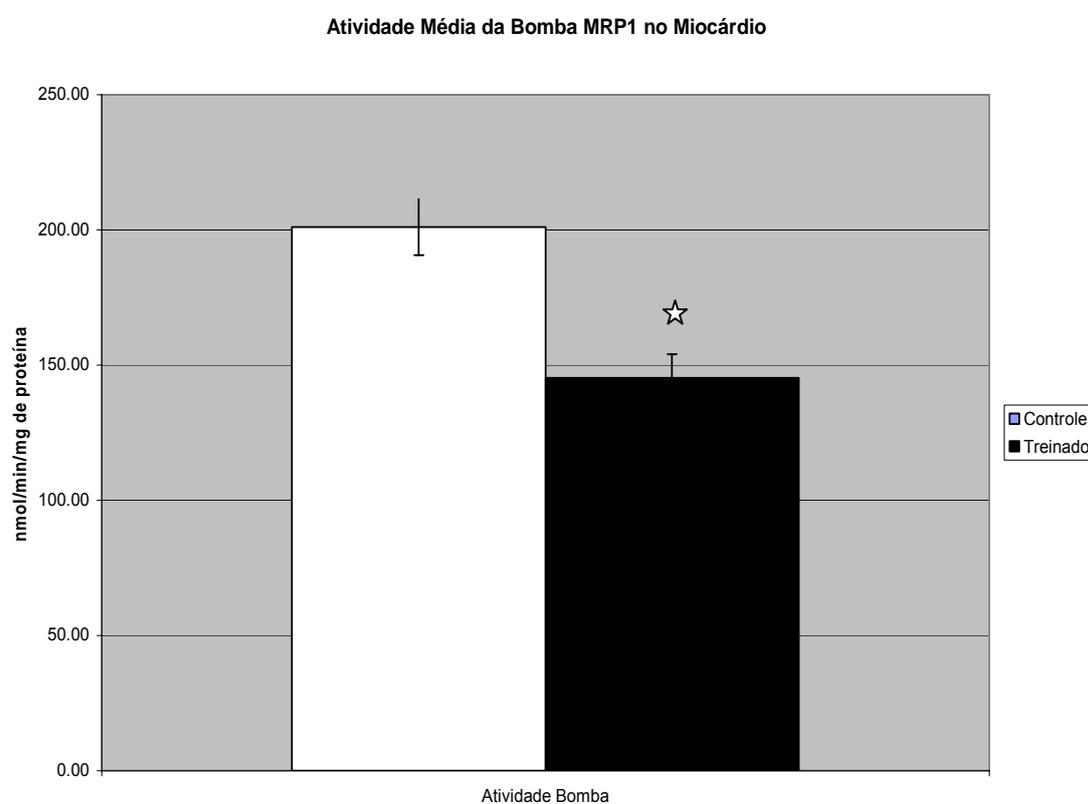


Figura 22. Atividade GS-x no miocárdio de ratos treinados. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

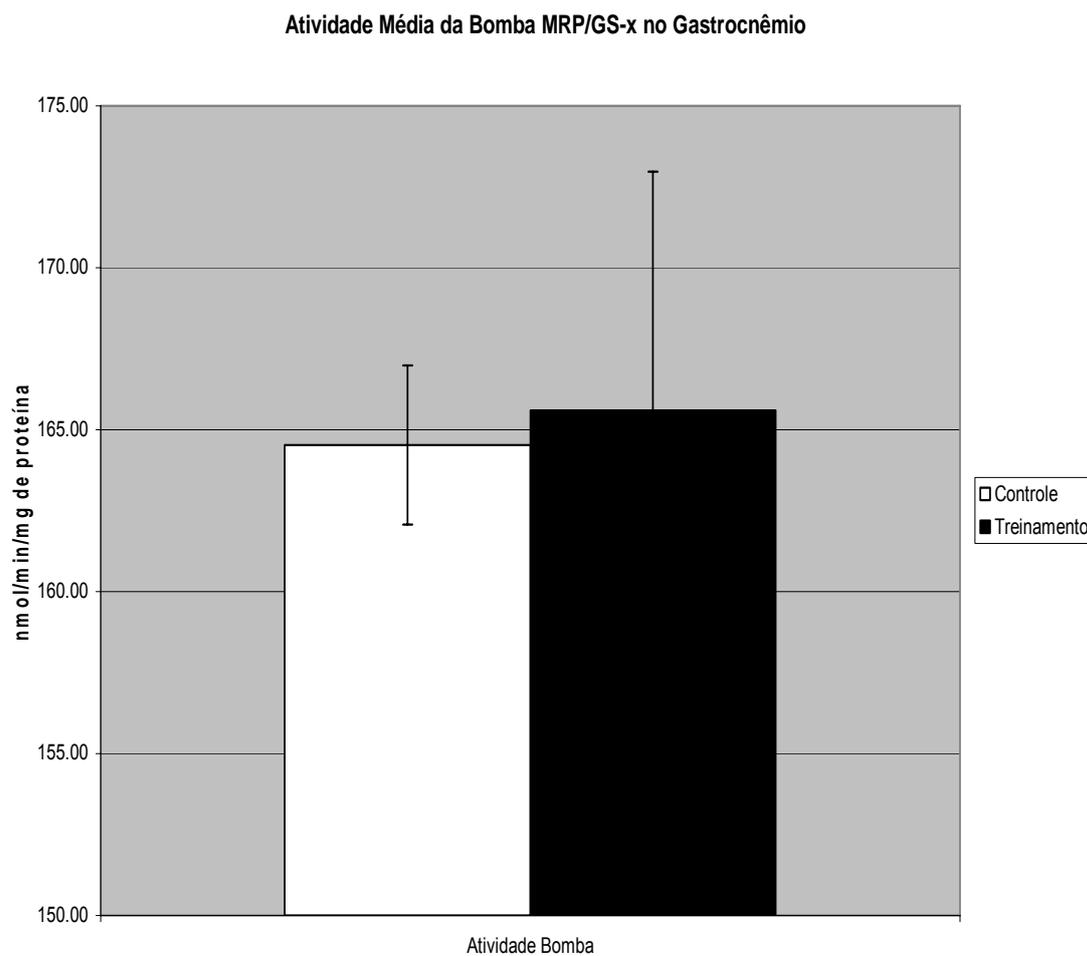


Figura 23. Atividade GS-x no gastrocnêmio de ratos treinados. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média.

4.8 Expressão de Proteínas de Choque Térmico (HSP70) e da bomba MRP1/GS-x no miocárdio e gastrocnêmio de ratos sedentários e treinados submetidos a exercício físico agudo

Os resultados a seguir são apresentados como a relação da expressão de HSP70 e MRP1 sobre a de β -actina e os valores são demonstrados em unidades arbitrárias.

Não houve expressão de HSP70 no miocárdio de ratos dos grupos controle agudo tampouco do grupo submetido ao exercício agudo, por esta razão, estes dados não foram demonstrados na tabela 6.

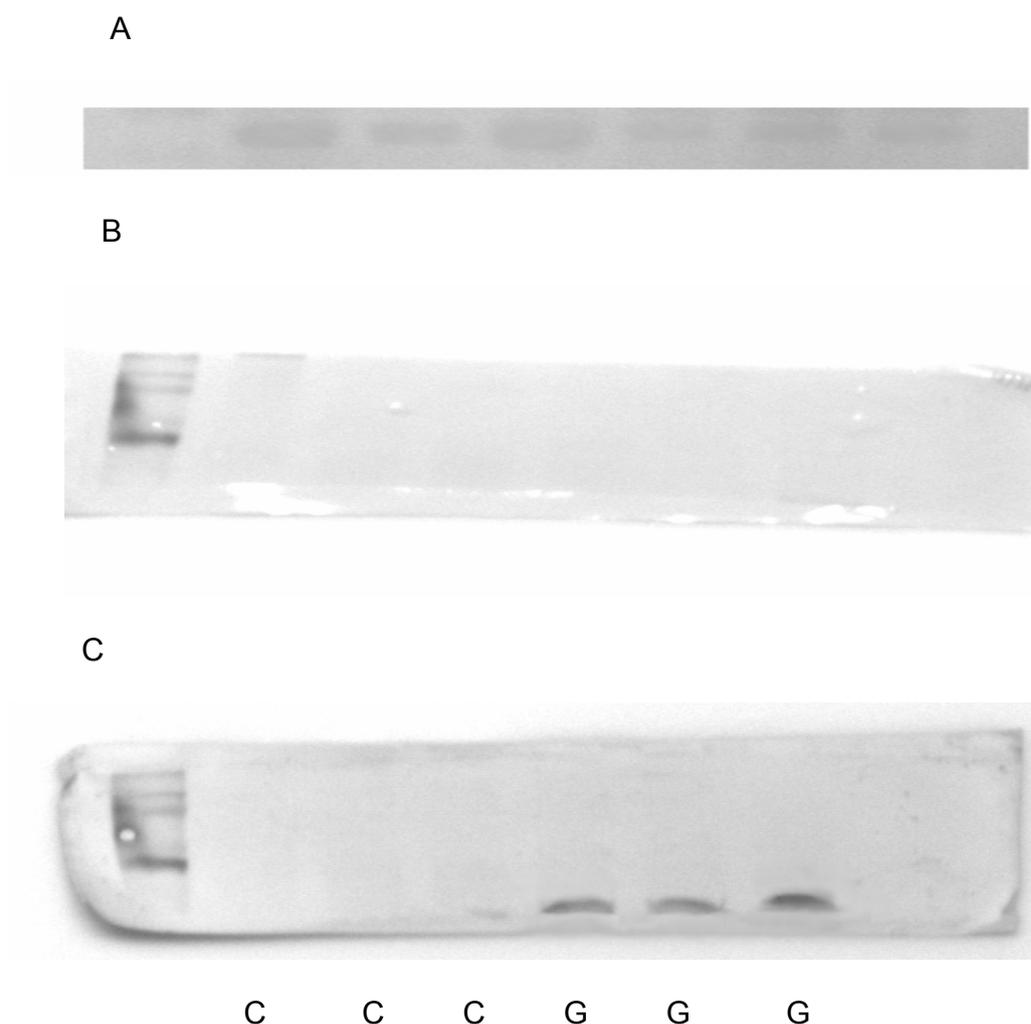
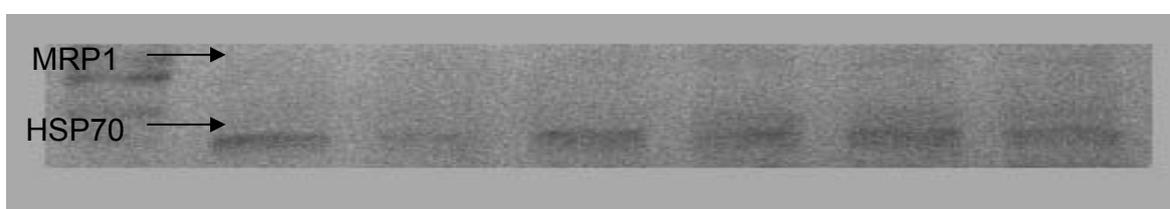


Figura 24. Expressão de HSP70 em animais sedentários submetidos ao exercício físico e seus respectivos controles sacrificados 6 horas após o exercício. A - Na imagem superior é possível visualizar o conteúdo de β -actina no gel de poliacrilamida corado com commassie blue. Na imagem abaixo (B) observa-se, na membrana de nitrocelulose, a ausência da expressão de HSP70 tanto no gastrocnêmio quanto no miocárdio dos grupos controles. As primeiras três bandas representam o músculo cardíaco (C) e as outras três o gastrocnêmio (G). C – Membrana de nitrocelulose dos animais submetidos a exercício agudo.

A



B



C

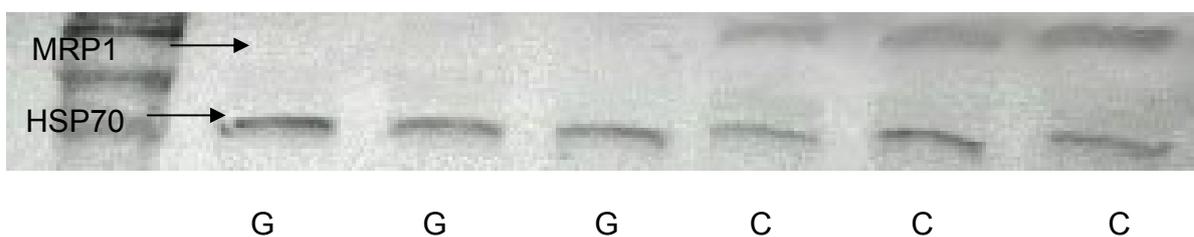


Figura 25. Expressão de HSP70 e MRP1 em ratos treinados sacrificados 6 horas após o exercício. A- Bandas de actina em gel corado com commassie blue; B – Membrana de nitrocelulose indicando a expressão de HSP70 e MRP1 no grupo controle treinado; C - Membrana de nitrocelulose indicando a expressão de HSP70 e MRP1 no exercício treinado. As três primeiras bandas são de amostras de gastrocnêmio (G) e as três últimas de miocárdio (C).

RATO	ACTINA	MRP	HSP70	Relação MRP/Actina	Relação HSP70/Actina
4	37287	13268	36860	0.355834	0.988548
5	48690	16329	37919	0.335367	0.778784
6	39549	15478	36373	0.391363	0.919695

Média relação 0.360855 0.895676
Desvio Padrão 0.028334 0.106925

**GRUPO
TREINADO**

RATO	ACTINA	MRP	HSP70	Relação MRP/Actina	Relação HSP70/Actina
1	51587	44638	43625	0.865296	0.845659
2	72187	49938	50330	0.691787	0.697217
3	73992	62386	52172	0.843145	0.705103

Média relação 0.800076 0.749326
Desvio Padrão 0.094433 0.083519

**GRUPO
CONTROLE**

RATO	ACTINA	MRP	HSP70	Relação MRP/Actina	Relação HSP70/Actina
4	49163		30820	0	0.626894
5	47197		25841	0	0.547514
6	52372		33166	0	0.633277

Média relação 0 0.602562
Desvio Padrão 0 0.04778

**GRUPO
TREINADO**

RATO	ACTINA	MRP	HSP70	Relação MRP/Actina	Relação HSP70/Actina
1	52751		43567	0	0.825899
2	35732		38103	0	1.066355
3	53984		40256	0	0.745702

Média relação 0 0.879319
Desvio Padrão 0 0.166868

Tabela 7. Expressão de HSP70 e MRP1 no miocárdio e gastrocnêmio de ratos treinados. Resultados em pixels e expressos sobre a relação HSP70/Actina e MRP1/Actina em unidades arbitrárias.

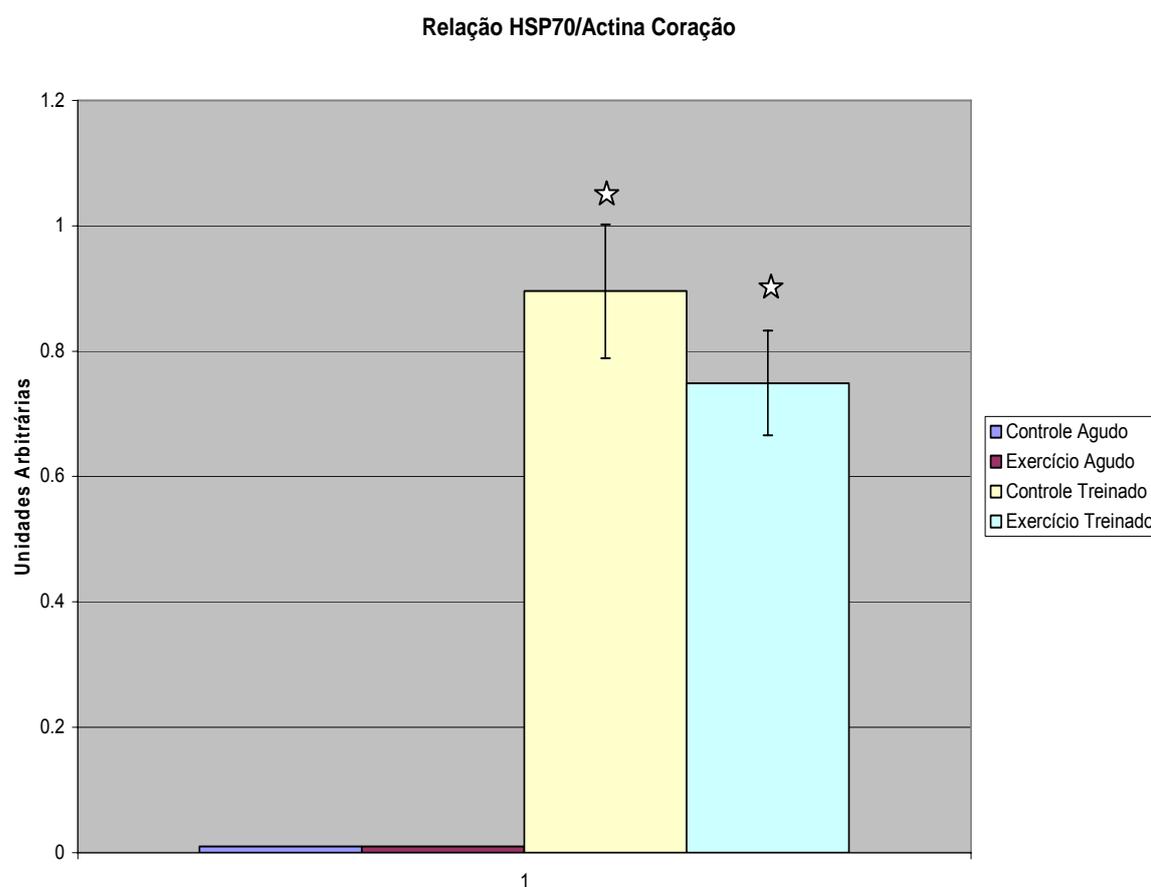


Figura 26. Expressão média de HSP70 no miocárdio de ratos sacrificados 6 horas após o exercício. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

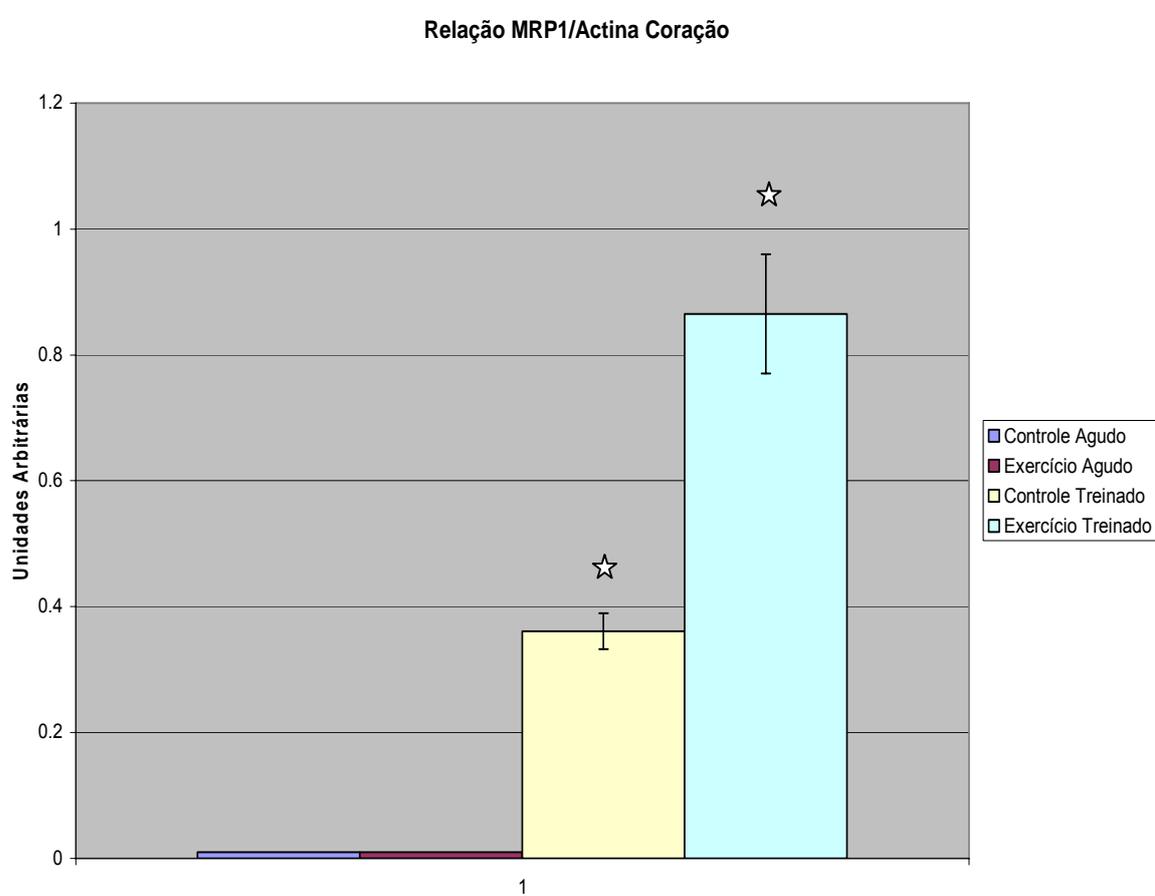


Tabela 27. Expressão de MRP1 em miocárdio de ratos sacrificados 6 horas após o exercício. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

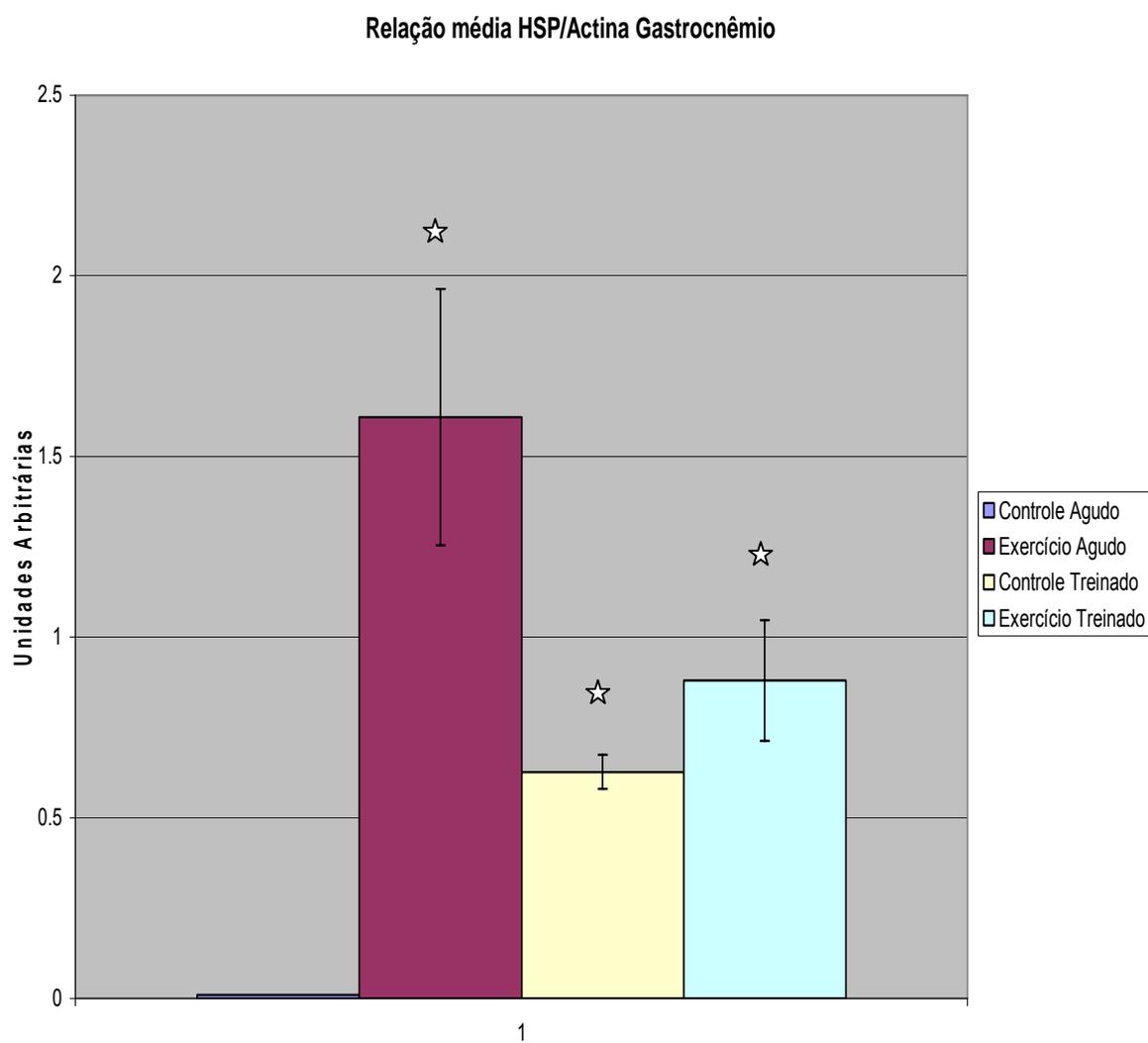


Figura 28. Expressão de HSP70 em gastrocnêmio de ratos treinados sacrificados 6 horas após o exercício . Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média, $p < 0,05$.

Os dados indicativos sobre a expressão de HSP70 no miocárdio demonstram um aumento nos grupos controle treinado e exercício treinado em relação ao controle e exercício agudo, porém não havia diferença entre eles. Por outro lado, o gastrocnêmio apresenta um pico elevado de expressão após o exercício agudo dos animais sedentários (61% maior que o controle treinado e 45% maior que no exercício treinado); não apresentando expressão nos animais do grupo controle agudo. O grupo exercício treinado expressou HSP70 28% mais que seu controle.

Com relação à expressão de MRP1, ficou claro que o gastrocnêmio de todos os grupos não expressou a proteína em quantidade suficiente para detecção pelo método utilizado. No miocárdio do grupo controle agudo e exercício agudo também não ocorreram diferenças na expressão de MRP1, no entanto, está é aumentada no grupo controle e aumentava ainda mais após o treinamento de natação de uma semana (58%).

4. DISCUSSÃO

Os efeitos do estresse oxidativo, independente do tecido atingido, levam ao dano de lípidos de membrana, DNA e proteínas necessárias para a função normal da célula. Com relação aos efeitos do estresse oxidativo e nitrosativo sobre as proteínas, este, pode alterar a função das mesmas por um fenômeno conhecido como glutatilação (KLATT et al, 2000). Este processo, se confere na adição covalente de glutatona aos resíduos de cisteína de diversas proteínas (formando um composto dissulfeto misto) e parece ser um candidato para explicar como as mudanças no estado redox induzidas por estresse oxidativo e nitrosativo pode ser transduzida a uma resposta celular funcional. Esta resposta de formação de compostos mistos de dissulfeto parece atuar com um mecanismo tampão do estresse oxidativo e de proteção de importantes proteínas contra a oxidação irreversível dos resíduos críticos de cisteínas regulando a atividade enzimática (ZIEGLER et al, 1985; THOMAS et al, 1995). A regulação da função de proteínas ocorre principalmente pela oxidação reversível de resíduos de metionina e de cisteína, ambos aminoácidos que apresentam enxofre em sua cadeia lateral. No primeiro caso, a metionina pode sofrer oxidação reversível a sulfóxido (em condições razoáveis de estresse oxidativo) ou irreversível a sulfonila (sob condições de estresse oxidativo severo). Sob a forma de sulfóxido, a proteína perde sua função temporariamente, mas pode, pela ação de redutases, recuperar sua forma original. Sobre a forma de sulfonila, a proteína perde definitivamente sua função (LEVINE et al, 1996). No segundo caso, os resíduos de cisteína

podem sofrer oxidação a ácidos sulfênicos (RSOH), sulfínico (RSO₂H) e sulfônico (RSO₃H). Nas formas sulfínica e sulfônica, compostos de formas estáveis, a redução não pode ser efetuada por enzimas redutases. Por outro lado sob a forma de sulfênico, um composto instável, pode ser reduzido a sua forma original (sendo assim um processo de oxidação reversível) ou ainda alternativamente oxidado a sulfinato e sulfonato (processo irreversível) ou ainda formar compostos de dissulfeto misto com GSH (CLAIBORNE et al, 1999). Conforme imaginado, o processo de modificação oxidativa em resíduos de cisteína e a conseqüente formação de dissulfetos mistos é totalmente dependente do estado redox celular, e estas modificações podem ser reversíveis após o retorno ao estado redox original (PRINZ et al, 1997). Aparentemente estas transformações sugerem uma estratégia imediata no combate aos possíveis danos irreversíveis causados por alterações no estado redox celular, que podem rapidamente alterar a homeostase celular de forma extremamente prejudicial.

Em nossos resultados verificamos que as concentrações de GSH e de GSSG, bem como o estado redox celular (razão de GSSG/GSH), encontraram-se inalteradas no exercício agudo em relação ao controle no miocárdio. Estes resultados se repetem ao avaliar as mesmas variáveis entre os grupos exercício treinados e seu respectivo grupo controle. No entanto, entre os conjuntos: controle agudo e exercício agudo versus controle treinado e exercício treinado, os valores basais já se encontravam mais elevados no segundo conjunto. Uma vez que um dos fatores de grande influencia no conteúdo de glutathiona intracelular é a disponibilidade de seus aminoácidos constituintes, seria possível ,para explicar

esse nível basal mais elevado, que a dieta tenha influenciado nos resultados dos animais estudados. O interessante destes resultados obtidos do metabolismo da glutatona no miocárdio dos ratos, é de que apesar da pequena diferença entre os conjuntos estudados, o comportamento das concentrações dos componentes estudados foi o mesmo, demonstrando que o miocárdio impede variações significativas no estado redox, mesmo sobre influencia do estresse fisiológico causado pelo exercício de natação.

Como proposto anteriormente, as variações no estado redox em células cardíacas tem grande importância no que concerne a alterações na função de proteínas. Como exemplo clássico de proteína que sofre influencia do estado redox, está o fator de transcrição NF- κ B. Este fator apresenta uma dupla variação de ativação ao estado redox, primeiramente, um estado pró-oxidativo é requerido para sua ativação inicial e, a posteriori, necessita de condições reduzidas para a sua ligação ao promotor no DNA. A primeira condição, é importante para ativar uma enzima (IKK) responsável pela degradação da proteína regulatória negativa do NF- κ B, a I κ B α . No segundo momento, pelo fato de que condições pró-oxidantes poderiam levar a oxidação e a conjugação com glutatona dos resíduos essenciais de ligação deste fator de transcrição (que devem apresentar carga positiva) junto à seqüência promotora no DNA (que apresenta carga essencialmente negativa), e que está impediria o início da transcrição de proteínas dependentes de sua ligação ao promotor e a sua conseqüente ativação, se faz necessária à predominância de condições redutoras para dar início a transcrição de proteínas dependentes do NF- κ B. Recentes evidências sugerem que a

resposta inflamatória participa no desenvolvimento da insuficiência cardíaca e que o NF- κ B estaria diretamente ligado a esta condição (VALEN et al, 2001). Miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca um aumento na ativação do NF- κ B e como consequência uma elevação na expressão de citocinas inflamatórias COX-2, TNF- α iNOS e moléculas de adesão celular (CAM's). Uma vez que para a ativação e ligação do NF- κ B se fazem necessárias condições específicas de estado redox, é de se pensar nos benefícios de manter estável o grau de ativação deste fator através da manutenção do estado redox celular no miocárdio. Nossos dados sugerem que o miocárdio, mesmo durante o estresse do exercício físico, bem como após uma semana de treinamento, é capaz de manter constante o conteúdo de glutathiona reduzida e oxidada e por conseguinte o estado redox celular, evitando assim, possíveis ativações indesejáveis deste fator de transcrição.

Dentre outras proteínas que podem ter sua função alterada como consequência de variações redox está o canal de potássio transiente de efluxo. As arritmias cardíacas são um dos problemas clínicos que mais contribuem com a incidência de morte súbita, e sua causa é originada de remodelamentos dos componentes elétricos do coração (NABAUER et al, 1995; NERBONNE et al, 2000). Apesar de os mecanismos da arritmogênese não serem completamente conhecidos, diversos estudos sugerem que a regulação a menos (downregulation) e a atividade dos canais de K transientes de efluxo possam estar envolvidos (TOMASELLI et al, 1999). A perda da função deste canal, pode levar a repolarização anormal e a possibilidade do início de mecanismo de reentrada da

corrente elétrica (PARK et al, 1997; QIN et al, 1996). Outra possível consequência da alteração na funcionalidade deste canal seria o aumento do conteúdo de cálcio intracelular a uma concentração na qual é possível o início de processos de contratatura e insuficiência cardíaca (KAPRIELIAN et al, 1999; WICKENDEN et al, 1998). Dentro desta perspectiva é interessante citar um trabalho de ROZANSKI et al (2002), onde foi estudado a influencia do metabolismo positivo da glutathione (a favor de um estado reduzido), induzido por alterações nas etapas limites da síntese e da disponibilidade de seus aminoácidos precursores, no remodelamento de canais de potássio em coração de ratos pós-infartados. Neste estudo foi demonstrado que em miocárdio de ratos pós-infartados havia uma regulação a menor dos canais de K transientes de efluxo, e que o conteúdo de GSH se encontrava diminuído e que esta diminuição estava associada à redução das enzimas glutathione redutase e γ -glutamylcysteine sintetase. Após o tratamento com N-acetylcysteine (precursor de glutathione) e de dicloroacetato (substancia que aumenta a atividade das vias da pentose) estas alterações de regulação a menor eram recuperadas, demonstrando que as alterações no estado redox induzidas pelo estresse oxidativo modula esta variável.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, os receptores de rianodina, que medeiam a liberação de cálcio a partir do retículo sarcoplasmático, bem como a bomba de cálcio (conhecida como SERCA), que bombeia os íons cálcio citoplasmáticos de volta ao retículo sarcoplasmático, são ambos suscetíveis a modificações redox. O mecanismo de ativação dos canais de rianodina do miocárdio se difere das células musculares esqueléticas (LAMB et al, 2000). No

músculo esquelético este é ativado por alterações de voltagem (BERS et al,2000) enquanto no miocárdio sua ativação ocorre estimulada por íons cálcio citoplasmáticos aumentados, e por conseguinte aparece como um mecanismo de amplificação onde um aumento inicial de cálcio citosólico induz um aumento ainda maior por parte dos canais de rianodina (RIOS et al, 1991). Sendo o cálcio, um íon que atua como segundo mensageiro ubíquo, participando de processos de transdução dos mais variáveis, na regulação de numerosas enzimas incluindo fosfatases, quinases, proteases fosfolipases e endonucleases, este deve ser mantido em concentrações estreitamente controladas. A oxidação dos grupos tiol dos canais de rianodina, induz a liberação do cálcio a partir do retículo sarcoplasmático. Já é um fato comprovado, que mudanças na razão GSSG/GSH (indicativo do estado redox celular) modificam a atividade do canal de rianodina (FENG et al, 2000; XIA et al, 2000; OBA et al, 2002). Em outros estudos realizados por ARACENA (2001) e HIDALGO (2002), foi demonstrado que aumentos de GSSG intracelular, estimulam a liberação de cálcio a partir dos canais de rianodina.

Com base nos comentários anteriores, fica perfeitamente claro que o miocárdio, como órgão essencial e permanentemente ativo, deve encontrar maneiras inteligentes de manter constantes o conteúdo de GSSG e seu estado redox nos mais variados desafios fisiológicos, para que assim não sofra os efeitos danosos do estresse oxidativo. Por conseguinte, nosso trabalho demonstrou que mesmo com o estresse do exercício forçado, bem como durante o treinamento físico, o miocárdio manteve constante seu estado redox.

Ao contrário do miocárdio, o gastrocnêmio sofreu grandes alterações no estado redox celular. Analisando o conteúdo de glutathiona oxidada nos grupos estudados, é possível notar que estes apresentam um comportamento parecido, onde o grupo exercício agudo apresenta maior conteúdo que seu controle. O mesmo se repete entre os grupos exercício treinado e controle treinado, porém aparentemente existe uma adaptação no que concerne a formação de GSSG ou a sua eliminação. O conteúdo de glutathiona reduzida nos grupos estudados também apresentou comportamentos semelhantes quando comparados com seus controles, no entanto, os níveis basais de GSH no grupo controle treinado já eram inferiores ao controle dos animais do exercício agudo. Esta alteração pode ser decorrente da dieta ou de possíveis alterações que o estresse da manipulação realizado por uma semana pode ter influenciado nos dados obtidos. Quando são observados os dados da razão GSSG/GSH verifica-se mais uma vez um comportamento semelhante entre os grupos, onde os exercícios apresentam uma forte alteração redox em suas células. Chama a atenção, a grande diferença encontrada no grupo exercício treinado, onde os níveis de estado redox atingem valores altíssimos. Para explicar este comportamento é possível especular que, o fato dos animais em questão terem sido exercitados diariamente por apenas uma semana possa ter ocasionado uma resposta inflamatória muscular e, como este processo é sabidamente um fator produtor de radicais livres é possível que esta alteração seja a causa dos resultados encontrados. Ainda na mesma linha de raciocínio é possível pensar que as células do sistema imunológico ativadas no processo de inflamatório, devido ao seu alto metabolismo, aumentaram o consumo de glutamina bem como a sua produção, alterando a disponibilidade dos

aminoácidos necessários à síntese de glutathiona no músculo. É possível também, especular que a depleção contínua de glutathiona e a não adaptação dos transportadores bem como das enzimas relacionadas à síntese de glutathiona em apenas uma semana de treinamento, tenha levado a este estado redox encontrado.

Para tentar explicar os resultados encontrados em ambos os tecidos no que se referem ao metabolismo da glutathiona e estado redox celular, podemos analisar os dados obtidos na expressão e atividade da bomba MRP1/GS-X. Nossa hipótese inicial, era de que o miocárdio poderia estar protegido dos danos associados ao estresse oxidativo e nitrosativo por um mecanismo de transporte ativo do conteúdo de glutathiona oxidada do citosol para o meio extracelular e desta maneira impedir alterações no estado redox celular.

Como citado na introdução, as GS-X são uma grande família de ATPases transportadoras de ânions e dependentes de magnésio. O termo “bomba GS-X” foi originalmente proposto, baseado na sua atividade transportadora com alta afinidade por S-conjugados de glutathiona, dissulfeto de glutathiona e cisteinil leucotrienos. Já em 1984, foi demonstrada pela primeira vez, a liberação de GSSG e de conjugados de GSH a partir de corações isolados e perfundidos (ISHIKAWA et al, 1984). Como as cardiomiopatias resultam de danos oriundos de estresse oxidativo imposto por hiperoxia ou administração de certas drogas, bem como situações de isquemia-reperfusão, o efluxo de GSSG foi sugerido como importante mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (ISHIKAWA et al, 1986). A identificação de proteínas liberadoras de GSSG das células, como a

MRP1 e 2 (LEIR et al, 1996), sugere que os membros da família das MRP's seja uma rota essencial para o controle intracelular dos níveis de GSSG e que as MRP's medeiam o transporte de GSSG como um mecanismo adaptativo para compensar o estresse oxidativo quando a GSSG redutase torna-se a etapa limitante. A liberação do conteúdo de GSSG é considerada um importante mecanismo de manutenção do potencial redox induzido pelos grupos tiols reduzidos. É consistente a esta visão, que o estresse oxidativo aumente a expressão de MRP1 em cultura de células (YAMANE et al, 1998). Em astrócitos de ratos submetidos a estresse oxidativo, já foi verificado que a bomba MRP1 medeia à liberação de GSSG em uma tentativa de defender-se contra os efeitos do estresse oxidativo, mantendo o estado redox inalterado (HIRRLINGER et al, 2001).

Os dados obtidos neste trabalho, demonstram que o miocárdio aumentou significativamente sua expressão de MRP1 somente nos grupos treinado controle e treinado exercício, sendo que a de maior significância foi neste último. Nos outros grupos, o miocárdio não apresentou expressão suficiente para ser identificada pelos métodos utilizados na revelação. O controle da expressão da MRP1, bem como as vias de sinalização que a controlam são muito pouco conhecidos. Como citado na introdução nem as seqüências do promotor de seu gene foram identificadas. No entanto, as vias de regulação do gene da MRP parece ocorrer através de estímulos de fatores externos, como por exemplo a radiação (OOSTHUIZEN et al, 2000; HARVIE et al, 1997). Estudos recentes apontaram diversas ligações entre a atividade da p53 e a expressão de mrp1. A

p53, aparentemente reduz a transcrição de mrp1 (VOLM et al, 1993) e em células mutantes com a p53 inativadas, os níveis de RNAm de mrp1 apresentam-se elevadas. A regulação negativa a partir da p53 parece ocorrer através de seus efeitos na transcrição de um ativador Sp-1 (WANG et al, 2000). Um estudo recente indicou que a expressão de mrp1 em células cancerígenas de esôfago não é controlada por choque térmico (STEIN et al, 1997). No entanto, esta evidência é limitada e novos estudos em diferentes linhagens de células devem ser realizados. Interessantemente a resistência a drogas anticâncer em pacientes com câncer de próstata, é associada a mutações no gene da PTEN, uma fosfatase que participa na inativação da via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Aparentemente, o aumento da atividade da PI3K leva a aumento da resistência a drogas anti-cancer. Interessantemente, a expressão de MRP1 mas não de MDR1 é observada. Juntos, estes dados sugerem uma via de comunicação cruzada entre a PI3K e o controle gênico das MRP's (LEE et al, 2002). Este último dado cria a possibilidade de que a regulação da expressão de MRP pode ocorrer por ativação da via PI3K ou por outros mecanismos de fosforilação. Como não existem dados na literatura para explicar os possíveis mecanismos de expressão da MRP1 em situações de exercício físico podemos especular que talvez, mecanismos de fosforilação induzidos pela ação de catecolaminas (por exemplo) podem estar envolvidos no controle da expressão de MRP, a longo prazo, após o treinamento físico. Nossos dados, de expressão de MRP1 no miocárdio sugerem que esta bomba pode ser, pelo menos em parte, pelo controle do estado redox celular em diversas situações estressantes como o exercício físico, e que na

tentativa de manter contante a relação GSSG/GSH a expressão desta proteína é aumentada.

Em contrapartida com a expressão aumentada de MRP1 no músculo cardíaco, o gastrocnêmio não apresentou expressão em decorrência do exercício agudo de uma hora tampouco após o treinamento de uma semana. Levando-se em consideração todas as alterações provocadas em células submetidas a estresse oxidativo e a alterações no estado redox celular, pode-se sugerir que o miocárdio encontra-se mais protegido que o gastrocnêmio no que concerne aos processos de mudança na função de proteínas.

Dada a importância do músculo cardíaco, era de se esperar também, uma atividade de transporte da bomba GS-x maior em relação ao músculo esquelético. Este fato foi confirmado em nosso trabalho onde foram encontrados, pela primeira vez, valores nos animais controle (músculo cardíaco), maiores em relação aos grupos controle do gastrocnêmio. A atividade da bomba GS-X no gastrocnêmio permanece inalterada após o treinamento, porém, interessante o miocárdio sofre uma significativa redução. A diminuição da atividade GS-x no miocárdio poderia ser explicada em função de que uma expressão aumentada de MRP1 no músculo cardíaco levaria a uma menor disponibilidade de substrato (GSSG) e por conseguinte uma redução em sua atividade. Estas alterações, na expressão e na atividade da MRP1 provavelmente têm importância na manutenção do estado redox celular, impedindo alterações no conteúdo de GSSG intracelular e por conseguinte impedindo alterações importantes na função de proteínas. A ausência da expressão de MRP1 no gastrocnêmio, mas a demonstração de que esta

apresenta atividade GS-X, sugere que o método de revelação não foi sensível para detectar alterações mínimas de expressão, ou ainda pela existência de outra MRP, por exemplo a MRP5, presente em diversos tecidos.

Entre as muitas estratégias desenvolvidas pelas células para lidar com mudanças adversas no ambiente como o estresse oxidativo, a expressão de HSP70 é uma das mais conservadas. Por esta razão, nossa hipótese era de que, ao se realizar uma sessão aguda de exercício físico de natação, a expressão de HSP70 encontrar-se-ia aumentada em ambos os tecidos, principalmente no gastrocnêmio, uma vez que o miocárdio estaria mais protegido contra os efeitos do estresse oxidativo e das variações redox, pela expressão aumentada de MRP1.

No miocárdio, a expressão de HSP70 não foi demonstrada no grupo controle agudo tampouco após uma sessão de exercício agudo. No entanto, quando observamos o grupo controle treinado, a expressão de HSP70 já se encontra aumentada e, após o exercício, não sofre alteração significativa. A ausência da expressão desta proteína de estresse no miocárdio dos animais submetidos ao exercício agudo poderia ser justificada pela ausência de estresse oxidativo. Em teoria, se não há estresse oxidativo, não existira desnaturação de proteínas e por conseguinte não se faria necessária a expressão de HSP70. No entanto, ambos os grupos, controle treinado e exercício treinado expressaram a proteína. Como se trata de uma proteína cuja função está associada à cardioproteção através de inúmeros mecanismos, seria incoerente se pensar que sua expressão não ocorresse após uma sessão de exercício agudo com animais

sedentários como foi demonstrado em nosso trabalho. Entretanto, cabe lembrar que a ativação do HSF1, fator de transcrição necessário para a síntese de HSP70, e sua fixação ao promotor no DNA é um mecanismo complexo, e que, como já demonstrado, a simples ligação HSF1-HSE no DNA não é suficiente para induzir a ativação transcripcional do HSF1, sugerindo um evento adicional na regulação deste fator de transcrição (JURIVICH et al, 1992). Acredita-se que a hiperfosforilação do HSF1 em seus resíduos de serina seguida de sua ligação ao HSE inicie sua atividade (XIA et al, 1997). Entre os candidatos a ativadores do HSF por fosforilação, estão a proteína quinase C ou PKC (quinase dependente de cálcio-fosfolípido) e a proteína quinase A ou PKA (quinase dependente de AMPcíclico). Durante o exercício, níveis elevados de catecolaminas no plasma e coração levam ao aumento da atividade da PKC e PKA, e estas participam na regulação de processos de mobilização de substratos energéticos, mudanças de fluxo iônico, desenvolvimento de força contrátil bem como da expressão gênica (SUGDEN et al, 1995; FRANCIS et al, 1982). Já foi demonstrado que a administração de agonistas β -adrenérgicos que aumentam a atividade da PKA, potencializam a expressão de HSP70 durante uma sessão aguda de exercício (PAROO et al, 1999), enquanto que autores demonstraram que o tratamento com inibidores de PKC diminuía a cardioproteção induzida pelo exercício (YAMASHITA et al, 2001). Em um estudo de MELLING & NOBLE (2004), foi sugerido que a PKC não estaria envolvida nos eventos iniciais da ativação do gene da HSP70, mas 24 horas após o exercício se faria importante, levando a um mecanismo de proteção posterior à célula cardíaca, abrindo a possibilidade de uma janela de controle da

expressão de HSP mais ampla. Este último dado, explicaria o fato da ausência da expressão de HSP70 após o exercício agudo, uma vez que os animais foram dissecados 6 horas após o exercício, e talvez, este tempo não foram suficientes para induzir a expressão da proteína. Nesta mesma perspectiva, com relação à expressão aumentada encontrada no miocárdio dos animais do grupo controle treinado, poderia ser explicado pelo provável aumento da temperatura corporal induzida pelo contato diário com a água aquecida (30°C) do aquário, uma vez que outro fator indutor da síntese de HSP70 no miocárdio e esquelético são as mudanças bruscas de temperatura.

Com relação à expressão de HSP70 no gastrocnêmio, a ausência de sua expressão no grupo controle agudo poderia ser explicada, em parte, assim como no músculo cardíaco, pela provável resposta retardada ao estresse, muito após as seis horas do exercício, e por conseguinte, essa resposta já seria visível no grupo controle treinado, onde neste a expressão foi clara. Obviamente, por adaptações decorridas do treinamento, a expressão de HSP70 nos animais treinados foi menor que a dos animais sedentários submetidos ao exercício agudo, resposta esta, já esperada.

Os nossos dados sugerem que, aparentemente, o músculo cardíaco apresenta-se mais protegido contra os danos do estresse oxidativo bem como das variações no estado redox induzidas pelo exercício físico, devido a sua intrínseca capacidade aumentada de exportar, via MRP1, os excessos de GSSG formado durante o estresse, evitando assim, importantes mudanças na função de suas proteínas. Por sua vez, o gastrocnêmio, mais suscetível ao dano oxidativo, teria

como principal mecanismo de proteção à expressão de HSP70 aumentada. No entanto, a expressão de HSP70 no miocárdio também se faz importante em diversos mecanismos de cardioproteção.

Somados, os resultados sugerem que uma aumentada atividade GS-X graças a um aumento na expressão da MRP1 possam ter sido uma adaptação evolutiva importante para impedir o estresse oxidativo no miocárdio em relação ao músculo esquelético. O significado fisiológico desses achados bem como suas possíveis aplicações terapêuticas encontra-se em estudo em nosso laboratório.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, apresentamos as conclusões abaixo:

- 1) O gastrocnêmio de animais sedentários submetidos a exercício agudo de natação (60 min) apresenta mudanças no estado redox celular, induzidas pelo estresse oxidativo, quando comparadas ao seu grupo controle. Apresenta expressão aumentada de HSP70 em relação ao controle e não expressa MRP1.
- 2) O gastrocnêmio de animais treinados submetidos a exercício agudo de natação comporta-se de maneira semelhante ao músculo do animal sedentário, porém de forma ainda mais acentuada. Expressa HSP70 de forma significativa em relação ao seu controle, mas esta é inferior ao conteúdo expresso no animal sedentário submetido ao exercício. . Não expressão MRP1 e apresenta atividade GS-x baixa e inalterada com o treinamento.
- 3) Ao contrário do músculo gastrocnêmio, o miocárdio de animais sedentários submetidos a exercício agudo de natação (60 min) não apresenta mudanças no estado redox celular quando comparadas ao seu grupo controle. Não

apresenta expressão de HSP70 em relação ao controle seis horas após o exercício tampouco de MRP1.

- 4) O miocárdio de animais treinados submetidos a exercício agudo de natação não apresenta variações no estado redox celular quando comparados ao seu controle. Expressa HSP70 de forma igual ao seu controle, mas esta é superior ao conteúdo expresso no animal sedentário submetido ao exercício. Expressa MRP1 de forma acentuada quando comparado ao seu controle e aos animais sedentários submetidos ao exercício agudo e apresenta atividade GS-X mais alta que o gastrocnêmio, porém esta é diminuída com o treinamento com o treinamento.
- 5) Tomados num todo, nossos resultados sugerem que a expressão da MRP1 e a conseqüente atividade das bombas GS-X no miocárdio sejam um fator diferencial que o confere resistência ao estresse oxidativo por exportar GSSG mais do que o músculo esquelético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKERBOOM, T. P. M. & SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.*, **77**:373-82, 1981.
2. AKERBOOM, T. P., Bilzer, M., Sies, H. The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver. (1982) *FEBS Lett.* 140:73-76.
3. ALLIKMETS, B. Gerrard, A. Hutchinson, M. Dean, Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database, *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 1649^1655.
4. AMIN, J., ANANTHAN, J. and VOELLMY R. Key features of heat shock regulatory elements. *Mol.Cell. Biol.* **8**: 3761-3769. 1988.
5. AMBUDKAR, S. Dey, C.A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, M.M. Gottesman, Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 (1999) 361^398.
6. ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.*, **113**:548-55, 1985.
7. ANDERSON JW, KAROUNOS D, YONEYAMA T, AND HOLLINGSWORTH JW. Dichloroacetate-induced changes in liver of normal and diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 149: 814–821, 1975.
8. ANDERSON ME AND LUO JL. Glutathione therapy: from prodrugs to genes. *Semin Liver Dis* 18: 415–424, 1998.

9. BAKOS, T. Hegedu' s, Z. Hollor , E. Welker, G.E. Tusnardy, G.J.R. Zaman, M.J. Flens, A. Varradi, B. Sarkadi, Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12322-12326.
10. BAKOS, R. Evers, G. Szakarcs, G.E. Tusnardy, E. Welker, K. Szabor , M. De Haas, L. Van Deemter, P. Borst, A. Varradi, B. Sarkadi, Functional multidrug resistance protein (MRP) lacking the N-terminal transmembrane domain, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 32167-32175.
11. BENJAMIN IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998; 83(2):117–32.
12. BELLMANN K, Burkart V, Bruckhoff J, Kolb H, Landry J. p38- dependent enhancement of cytokine-induced nitric-oxide synthase gene expression by heat shock protein 70. *J Biol Chem* 2000;275:18172–18179.
13. BERSIN RM AND STACPOOLE PW. Dichloroacetate as metabolic therapy for myocardial ischemia and failure. *Am Heart J* 134: 841–855, 1997
14. BERRIDGE MJ, LIPP P, BOOTMAN MD (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21
15. BEUCKELMANN DJ, NABAUER M, AND ERDMANN E. Alterations Na⁺bauer M and Ka⁺a⁺b S. Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovasc Res* 37: 324–334, 1998.

16. BLUHUM WF, Martin JL, Mestril R, Dillmann WH. Specific heat shock protect microtubules during simulated ischemia in cardiac Am J Physiol 1998;275:H2243–H2249.
17. BRAR BS, Stephanou A, Wagstaff MJD et al. Heat shock proteins delivered with a virus vector can protect cardiac cells against apoptosis as well as against thermal or ischaemic stress. J Mol Cell 1999;31:135–146.
18. BRUCE JL, Price BD, Coleman CN, Calderwood SK. Oxidative injury rapidly activates the heat shock transcription factor but fails to increase levels of heat shock proteins. Cancer Res 1993;53(1):12–5.
19. BRUEY J-M, Ducasse C, Bonniaud P et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. Nat Cell Biol 1994;93:759–767. 2000;2:645–652.
20. BUCCHLER, J. König, M. Brom, J. Kartenbeck, H. Spring, T. Horie, D. Keppler, cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats, J. Biol. Chem. 271 (1996) 15091–15098.
21. BEERE HM, Wolf BB, Cain K et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 Nat Cell Biol 2000;2:469–475.
22. CARAFOLI E (2002) Calcium signaling: a tale for all seasons. Proc Natl Acad Sci USA 99:1115-1122
23. CARLBERG, I. & MANNERVIK, B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* **113**:484-90, 1985.

24. CECILIA HIDALGO^{1,2}, PAULA ARACENA, GINA SANCHEZ¹ AND PAULINA DONOSO¹. Redox regulation of calcium release in skeletal and cardiac muscle. *Biol Res* 35: 183-193, 2002
25. CHEN, H.W. YANG, H.L., JING, H.H., TSAI, Y.F., TSAI, L.Y, CHEN, S.S., YANG, R.C. Synthesis of HSP70 induced by exercise in high temperature. *Chin. J. Physiol.* **38**:241-246. 1995.
26. CHU B, Zhong R, Soncin F, Stevenson MA, Calderwood SK. Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37 °C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 and protein kinases Calpha and Czeta. *J Biol Chem* 1998; 273(29):18640–6.
27. CHU B, Soncin F, Price BD, Stevenson MA, Calderwood SK. Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. *J Biol Chem* 1996;271(48):30847–57.
28. CLANTON TL; ZUO L; KLAWITTER P. Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. *Proc Soc Exp Biol Med*; **222**(3):253-62, 1999.
29. CLARKSON P.M., SAYERS, S.P. Etiology of exercise-induced muscle damage. *Can. J. Appl. Physiol.* **24**(3): 234-48. 1999.
30. COLE, G. Bhardwaj, J.H. Gerlach, J.E. Mackie, C.E. Grant, K.C. Almquist, STEWART, E.U. Kurz, A.M. Duncan, R.G. Deeley, *Science* 258 (1992) 1650^1654.

31. COYLE, E.F. Physical activity as a metabolic stressor. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**(2 Suppl): 512S-20S. 2000.
32. CUI, J. Ko' nig, U. Buchholz, H. Spring, I. Leier, D. Keppler, Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol. Pharmacol.* **55** (1999) 929^937.
33. DEL AGUILA, L.F. KRISHNAN, R.K., ULBRECHT, J.S., FARRELL, P.A., CORRELL, P.H. LANG, C.H., ZIERATH, J.R., KIRWAN, J.P. Muscle damage impairs insulin stimulation of IRS-1, PI 3-kinase and Akt-kinase in human skeletal muscle. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**(1): E206-12. 2000.
34. DUMAZ N, Marais R. Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *J Biol Chem* 2003;278(32):29819–23.
35. ELIA, G. & SANTORO, M. G. Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells. *Biochem. J.*, **300**:201-9, 1994.
36. ESSIG, D.A. AND NOSEK, T.M. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: A dual function of reactive oxygen species? *Can. J. Appl. Physiol.* **22**(5): 409-428. 1997.
37. ESSIG, D.A., BORGER, D.R., JACKSON D.A. Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA in skeletal muscle following contractions. *Am. J. Physiol.* **272**(1 Pt 1): C59-67. 1997.

38. FEBBRAIO, M.A. AND KOUKOULAS, I. HSP70 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. J. Appl. Physiol. **89**(3): 1055-60. 2000.
39. FEHRENBACH, E. AND NIESS, A.M. Role of heat shock proteins in the exercise response. Exercise Immunology Review. **5**: 57-77. 1999.
40. FEHRENBACH, E., PASSEK, F., NIESS, A.M., POHLA, H., WEINSTOCK, C., DICKHUTH, H.H., NORTHOFF, H. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. Méd. Sci. Sports Exerc. **32**(3): 592-600. 2000.
41. FLENS, M. et al. (1996) Tissue distribution of the multidrug resistance protein. Am J. Pathol. 148:1237-1247.
42. FRANCIS GS, Goldsmith SR, Ziesche SM, Cohn JN. Response of plasma norepinephrine and epinephrine to dynamic exercise in patients with congestive heart failure. Am J Cardiol 1982;49(5):1152–6.
43. FREEMAN ML, Borrelli MJ, Syed K, Senisterra G, Stafford DM, Lepock JR. Characterization of a signal generated by oxidation of protein thiols that activates the heat shock transcription factor. J Cell Physiol. 1995 Aug;164(2):356-66.
44. GABAI VL, Yaglom JA, Volloch V et al. Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death. Mol Cell Biol 2000;20:6826– [75]
45. GARCIA-CARDENA G, Fan R, Shah V et al. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. Nature 1998;392:821

46. GARRIDO C, Bruey J-M, Fromentin A et al. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J* 1999;13:2061–2070.
47. GEORGE J. ROZANSKI AND ZHI XU. Glutathione and K_v channel remodeling in postinfarction rat heart 282:2346-2355, 2002. First published Jan 31, 2002; doi:10.1152/ajpheart.00894.2001 *AJP - Heart*
48. GOBATTO C., Mello, A., Kokobun E. Maximal lactate steady state rats submitted to swimming exercise. *Comp. Bioch. And Phys Part A* 130 (2001) 21-27.
49. GONZALEZ B., HERNANDO, R., MANSO, R. Stress proteins of 70 kDa in chronically exercised skeletal muscle. *Pflugers Arch.* **440**(1): 42-9. 2000.
50. GROSS, S.S., WOLIN, M.S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* **57**:737-769. 1995.
51. HAFNER S, Adler HS, Mischak H, Janosch P, Heidecker G, Wolfman A, et al. Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol Cell Biol* 1994;14(10):6696–703.
52. HAMMOND, G.L., LAI, Y.K. LAI, E MARKERT, C.L. Diverse forms of stress lead to new patterns of gene expression through a common and essential metabolic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:3485-3488. 1982.
53. HATAYAMA T, Hayakawa M. Differential temperature dependency of chemical stressors in HSF1-mediated stress response in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Nov 30;265(3):763-9.

54. HERNANDO, R., MANSO, R. Muscle fibre stress in response to exercise: synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. Eur. J. Biochem. **243**(1-2): 460-7. 1997.
55. HIPFNER, K.C. Almquist, B.D. Stride, R.G. Deeley, S.P.C. Cole, Location of a protease-hypersensitive region in the multidrug resistance protein (MRP) by mapping of the epitope of MRP-specific monoclonal antibody QCRL-1. *Cancer Res.* 56 (1996) 3307^3314.
56. HIROHASHI, H. Suzuki, Y. Sugiyama, J. ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *Biol. Chem.* 274 (1999) 15181^15185
57. HOMOLYA L, VARADI A, SARKADI B. Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors.* 2003;17(1-4):103-14.
58. HOLMBERG CI, Roos PM, Lord JM, Eriksson JE, Sistonen L. Conventional and novel PKC isoenzymes modify the heat-induced stress response but are not activated by heat shock. *J Cell Sci* 1998;111(Pt22):3357-65.
59. HOLMBERG CI, Hietakangas V, Mikhailov A, Rantanen JO, Kallio M, Meinander A, et al. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J* 2001;20(14): 3800-10.
60. HUANG LE, Zhang H, Bae SW, Liu AY. Thiol reducing reagents inhibit the heat shock response. Involvement of a redox mechanism in the heat shock signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1994 Dec 2;269(48):30718-25.

61. INOUE, M. Akerboom, T. P., Sies, H. Biliary transport of glutathione S-conjugate by rat liver canalicular membrane vesicles. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:4998-5002.
62. ISHIKAWA T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. Trends Biochem Sci 1992; 17:463-8.
63. ISHIKAWA, T. And Sies, H. Cardiac transport of glutathione disulfide and S-conjugate. Studies with isolated perfused rat heart during hydroperoxide metabolism. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:3838-3843.
64. ISHIKAWA, T. And Sies, H. Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide. (1986) *FEBS Lett.* 200:128-132.
65. ISHIKAWA, T. And Sies, H. Role of cardiac glutathione transferase and of the glutathione S-conjugate export system in biotransformation of 4-hydroxynonenal in the heart. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:1576-1581.
66. ITO, H. Suzuki, T. Hirohashi, K. Kume, T. Shimizu, Y. Sugiyama, Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am. J. Physiol.* 272 (1997) G16^G22.
67. JACKSON MJ. Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation? Proc Nutr Soc; **58**(3):673-6, 1999.).
68. JAATTELA M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like. proteases. *EMBO J* 1998;17:6124–6134.

69. JACQUIER-SARLIN MR, Polla BS. Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin. *Biochem J.* 1996 Aug 15;318 (Pt 1):187-93.
70. JANSEN, W.H. Peters, W.H. Lamers, Hereditary chronic conjugated hyperbilirubinemia in mutant rats caused by defective hepatic anion transport, *Hepatology* 5 (1985) 573^579.
71. JEDLITSCHKY, I. Leier, U. Buchholz, M. Center, D. Keppler, Hepatobiliary elimination of the peroxisome proliferator nafenopin by conjugation and subsequent ATP-dependent transport across the canalicular membrane. *Cancer Res.* 54 (1994) 4833^4836.
72. JEDLITSCHKY, I. Leier, U. Buchholz, K. Barnouin, G. Kurz, D. Keppler, Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* 56 (1996) 988^994.
73. JEDLITSCHKY, I. Leier, U. Buchholz, J. Hummel-Eisenbeiss, B. Burchell, D. Keppler, ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem. J.* 327 (1997) 305^ 310.
74. JOHENNES HIRRLINGER,* Jo»rg Ko»nig,² Dietrich Keppler,² Jo»rg Lindenau,³ Jo»rg B. Schulz³ and Ralf Dringen* The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress *J. Neurochem.* (2001) 76, 627±636.
75. JOYEUX M, Baxter GF, Thomas DL, Ribuoat C, Yellon DM. Protein kinase C is involved in resistance to myocardial infarction induced by heat stress. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(12):3311–9.

76. JURIVICH DA, Sistonen L, Kroes RA, Morimoto RI. Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science* 1992;255 (5049):1243–5.
77. KAPRIELIAN R, WICKENDEN AD, KASSIRI Z, PARKER TG, LIU PP, AND BACKX PH. Relationship between K_v channel downregulation and [Ca²⁺]_i in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 517: 229–245, 1999.
78. KAST, P. Gros, J. Biol. Chem. 272 Topology mapping of the amino-terminal half of multidrug resistance-associated protein by epitope insertion and immunofluorescence. (1997) 26479[^]26487.
79. KAST, P. Gros, Biochemistry 37 Membrane topology of P-glycoprotein as determined by epitope insertion: transmembrane organization of the N-terminal domain of mdr3. (1998) 2305[^]2313.
80. KAUFFMANN a, Sylvia Pfannschmidt a, Heike Zoeller a, Anke Benz a, Birgit Vorderstemann a, Jeanette I. Webster b, Dieter Schrenk a,* Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression. *Toxicology* 171 (2002) 137–146
81. KELLY, D.A., TIIDUS, P.M., HOUSTON, M.E. AND NOBLE, E.G. Effect of vitamin E on HSP70 induction. *Can.J. Appl. Physiol.* **18**:413P. 1993.
82. KIANG JG, Carr FE, Burns MR, McClain DE. HSP-72 synthesis is promoted by increase in [Ca²⁺]_i or activation of G proteins but not pHi or cAMP. *Am J Physiol* 1994;267(1 Pt 1):C104–14.

83. KIANG JG, Gist ID, Tsokos GC. Cytoprotection and regulation of heat shock proteins induced by heat shock in human breast cancer T47-D cells: role of $[Ca^{2+}]_i$ and protein kinases. *FASEB J* 1998;12(14): 1571–9.
84. KEEF KD, Hume JR, Zhong J. Regulation of cardiac and smooth muscle Ca^{2+} channels (Ca(V)1.2a,b) by protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281(6):C1743–56.
85. KIM Y-M, deVera ME, Watkins SC, Billiar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 1997;272:1402–1411.
86. KIM K, Kim M, LEE D. The Effect of Exercise in Cool, Control and Hot Environments on Cardioprotective HSP70 Induction. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 23(6): 225–230, 2004
87. KIANG JG, Kiang SC, Juang YT, Tsokos GC. *N*(omega)-nitro-Larginine inhibits inducible HSP-70 via Ca^{2+} , PKC, and PKA in human intestinal epithelial T84 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282(3):G415–23.
88. TANIGUCHI, M. Wada, K. Kohno, T. Nakamura, T. Kawabe, M. Kawakami, K. Kagotani, K. Okumura, S. Akiyama, M. Kuwano, A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation, *Cancer Res.* 56 (1996) 4124–4129.
89. KNAUF U, Newton EM, Kyriakis J, Kingston RE. Repression of human heat shock factor 1 activity at control temperature by phosphorylation. *Gene Dev* 1996;10(21):2782–93.

90. KLIME MP, Morimoto RI. Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1997;17(4):2107–15.
91. KOBAYASHI, K., Komatsu, S. and Hayashi, K. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 622-626.
92. KOOL, M. De Haas, G.L. Scheper, R.J. Scheper, M.J.T. Van Eijk, J.A. Juijn, F. Baas, P. Borst, Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologs of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines, *Cancer Res.* 57 (1997)3537^3547.
93. KOOL. Van der Linden, M. De Haas, F. Baas, P. Borst, Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells, *Cancer Res.* 59 (1999) 175^182.
94. KROHNE-EHRICH, G.; SCHIRMER, R. H.; UNTUCHT-GRAU, R. Glutathione reductase from human erythrocytes. Isolation of the enzyme and sequence analysis of the redox-active peptides. *Eur. J. Biochem.*, **80**:65-71, 1971.
95. KUKREJA RC, QianYZ, Okubo S, Flaherty EE. Role of protein kinase C and 72 kDa heat shock protein in ischemic tolerance following heat stress in the rat heart. *Mol Cell Biochem* 1999;195(1–2):123–31.
96. LAMB GD (2000) Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27:216-224
97. LEEUWENBURGH, C. HANSEN, P.A., HOLLOSZY, J.O., HEINECKE, J.W. Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein

- oxidation and levels of urinary dityrosine. Free Radic. Biol. Med. **27**(1-2):186-92. 1999.
98. LEE, Jr.¹, Linda S. Steelman¹ and James A. McCubrey^{1,2} Phosphatidylinositol 3'-Kinase Activation Leads to Multidrug Resistance Protein-1 Expression and Subsequent Chemoresistance in Advanced Prostate Cancer Cells (2003).
99. LEIR, I. Jedlischky, G. Buchohhltz, U., Cole, S.P. C. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 27807-27810.
100. LEIER, I.; Jedlitschky, G.; Buchholz, U.; Center, M.; Cole, S. P. C.; Deeley, R. G.; Keppler, D. ATP-dependent glutathione disulphide transport by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem. J.* **314**:433–437; 1996.
101. LEVINE, R.L., MOSONI, L., BERLETT, B.S. & STADTMAN, E.R. (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 15036±15040.
102. LOKTIONOVA SA, Ilyinskaya OP, Kabakov AE. Early and delayed tolerance to simulated ischemia in heat-preconditioned endothelial cells: a role for HSP27. *Am J Physiol* 1998;**275**:H2147–H2158.
103. LOCKE, M. AND NOBLE, E.G. Stress proteins: The exercise response. Can. J. Appl. Physiol. **20**(2):155-167. 1995.

104. LOCKE, M. TANGUAY, R.M., KLABUNDE, R.E., IANUZZO, C.D. Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP70. Am. J. Physiol. **269**(1 Pt 2): H320-5. 1995.
105. LOCKE, M., NOBLE E.G., TANGUAY, R.M., FEILD, M.R., IANUZZO, S.E. E IANUZZO, C.D. Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. Am. J. Physiol. **268**. 1995.
106. LOCKE, M., NOBLE, E.G. AND ATKINSON, B.G. Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. Am. J. Physiol. **261** (Cell Physiol. 30): C774-C779. 1991.
107. LOCKE M, Tanguay RM, Klabunde RE, Ianuzzo CD. Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP 72. *Am J Physiol* 1995;269(1 Pt 2):H320–5.
108. LOE, D. W.; Almquist, K. C.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C₄ and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J. Biol. Chem.* **271**:9675–9682; 1996.
109. LII, C.K., CHAI, Y.C., ZHAO, W., THOMAS, J.A. & HENDRICH, S. (1994) S-Thiolation and irreversible oxidation of sulfhydryls on carbonic anhydrase III during oxidative stress: a method for studying protein
110. LIU H, Lightfoot R, Stevens JL. Activation of heat shock factor by alkylating agents is triggered by glutathione depletion and oxidation of protein thiols.
J Biol Chem. 1996 Mar 1;271(9):4805-12.

111. LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-75, 1951.
112. LOE, D. W.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res.* **58**:5130–5136; 1998.
113. M.J. FLENS, G.J.R. Zaman, P. Van der Valk, M.A. Izquierdo, A.B. Schroeijers, G.L. Scheer, M. De Haas, C.J.L.M. Meijer, R.J. Scheper, Tissue distribution of the multidrug resistance-associated protein, *Am. J. Pathol.* **148** (1996) 1237-1247.
114. MAYER, J. Kartenbeck, M. Buchler, G. Jedlitschky, I. Leier, D. Keppler, Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. *J. Cell Biol.* **131** (1995) 137-150.
115. MEISTER, A. (1989) *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical aspects – Part A*, John Wiley and Sons, New York, pp.367-474.
116. MEISTER, A. and Anderson, M. (1983) *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 711-760.
117. MELLING J, Thorp D, Noble E. Regulation of myocardium heat shock protein 70 gene expression following exercise. *J Mol Cell Cardiol* 2004; **37**: 847-855.
118. MANNERVIK, B. & GLUTHENBERG, C. Glutathione transferase, *Methods Enzymol.*, **77**:231-5, 1981.

119. MANNERVIK, B. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, **113**:490-5, 1985.
120. MEYER, T.N. E DA SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. *Rev. Ass. Med. Brasil.* **45**(2): 181-188. 1999.
121. NERBONNE JM. Molecular basis of functional voltage-gated K_v channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* **252**: 285–298, 2000.
122. MINOWADA, G., WELCH W.I. Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest.* **95**:3-12. 1995.
123. Moustafa MA, Ogino D, Nishimura M, Ueda N, Naito S, Furukawa M, Uchida T, Ikai I, Sawada H, Fukumoto M.. Comparative analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporter gene expression levels in peripheral blood leukocytes and in liver with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2004; **95**: 530–536.
124. NIESS, A.M., DICKHUTH, H.-H., NORTHOFF, H. Free radicals and oxidative stress in exercise-immunological aspects. *Exercise Immunology Review.* **5**:22-26. 1999.
125. NOBLE, E.G., MORASKA, A., MAZZEO, R.S., ROTH, D.A., OLSSON, M.C., MOORE, R.L., FLESHNER, M. Differential expression of stress proteins in rat myocardium after free wheel or treadmill run training. *J. Appl. Physiol.* **86**(5):1696-701. 1999.

126. OHNISHI K, Wang X, Takahashi A, Matsumoto H, Aoki H, Ohnishi T. Effects of protein kinase inhibitors on heat-induced hsp72 gene expression in a human glioblastoma cell line. *Cell Signal* 1998;10(4):259–64.
127. OHNISHI K, Wang X, Takahashi A, Matsumoto H, Ohnishi T. The protein kinase inhibitor, H-7, suppresses heat induced activation of heat shock transcription factor 1. *Mol Cell Biochem* 1999;197(1–2):129–35.
128. HOJ A, Jakobsen BK. A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation. *EMBO J* 1994;13(11):2617–24.
129. OUDE Elferink, R. et al. (1990) *Am. J. Physiol.* 258:699-706.
130. OVSENEK N. Glycogen synthase kinase 3beta negatively regulate both DNA-binding and transcriptional activities of heat shock factor 1. *J Biol Chem* 2000;275(37):29147–52.
131. PAK PH, NUSS B, TUNIN RS, KAAB S, TOMASELLI GF, AND MARBAN E. Repolarization abnormalities, arrhythmia and sudden death in canine tachycardia-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 30: 576–584, 1997.
132. PARK H-S, Lee J-S, Huh S-H, Seo J-S, Choi E-J. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J* [76] 2001;20:446–456.
133. PAROO, Z., NOBLE E.G. Isoproterenol potentiates exercise-induction of HSP70 in cardiac and skeletal muscle. *Cell Stress Chaperones*, 4(3): 199-204. 1999.

134. PAROO, Z., TIIDUS, P.M., NOBLE, E.G. Estrogen attenuates HSP70 expression in acutely exercised male rodents. *Eur.J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **80**(3): 180-4. 1999.
135. PAROO Z, Tiidus PM, Noble EG. Estrogen attenuates HSP 72 expression in acutely exercised male rodents. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1999 Aug;80(3):180-4.
136. PAROO Z, Haist JV, Karmazyn M, Noble EG. Exercise improves postischemic cardiac function in males but not females: consequences of a novel sex-specific heat shock protein 70 response. *Circ Res* 2002;90(8):911–7.
137. Paulusma, C.; Oude Elferink, R. P. J.; Baas, F.; Borst, P. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:7690–7694; 1995.
138. PAULUSMA, C., et al(1996). Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 271:1126-1128.
139. PAULUSLA, C. C.; van Geer, M. A.; Evers, R.; Heijn, M.; Ottenhoff, R.; Borst, P.; Oude Elferink, R. P. Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem. J.* **338**: 393–401; 1999.
140. PELZER S, Shuba YM, Asai T, Codina J, Birnbaumer L, McDonald TF, et al. Membrane-delimited stimulation of heart cell calcium current by beta-adrenergic signal-transducing Gs protein. *AmJ Physiol* 1990;259(1 Pt 2):H264–7.

141. POWERS, S.K., DEMIREL, H.A., VINCENT, H.K., COOMBES, J.S., NAITO, H., HAMILTON, K.L., SHANELY, R.A., JESSUP, J. Exercise training improves myocardial tolerance to *in vivo* ischemia-reperfusion in the rat. *Am. J. Physiol.* **275**(5 Pt 2): R1468-77. 1998.
142. PRICE BD, Calderwood SK. Ca²⁺ is essential for multistep activation of the heat shock factor in permeabilized cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11(6):3365–8.
143. PRINZ, W.A., SLUND, F., HOLMGREN, A. & BECKWITH, J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **272**, 15661±15667.
144. QIN D, ZHANG Z, CAREF EB, BOUTJDIR M, JAIN P, AND EL-SHERIF N. Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. *Circ Res* 79: 461–473, 1996.
145. RADAK Z; KANEKO T; TAHARA S; NAKAMOTO H; OHNO H; SASVARI M; NYAKAS C; GOTO S The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med*; **27**(1-2):69-74, 1999.
146. RADEGRAN G; HELLSTEN Y. Adenosine and nitric oxide in exercise-induced human skeletal muscle vasodilatation. *Acta Physiol Scand*; **168**(4):575-91, 2000 Apr.
147. RAPPA, G.; Lorico, A.; Flavell, R. A.; Sartorelli, A. C. Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a cotransporter of glutathione and natural product toxins. *Cancer Res.* **57**:5232–5237; 1997.

148. REBBEOR, J. F.; Connolly, G. C.; Dumont, M. E.; Ballatori, N. ATP-dependent transport of reduced glutathione on YCF1, the yeast orthologue of mammalian multidrug resistance associated proteins. *J. Biol. Chem.* **273**:33449–33454; 1998.
149. RÍOS E, PIZARRO G (1991) Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol Rev* 71:849-908
150. RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **13**: 571-573. 1962.
151. RYAN P. Taylor, M. Brennan Harris, And Joseph W. Starnes. Acute Exercise Can Improve Cardioprotection Without Increasing Heat Shock Protein Content. *Am. J. Physiol.* 276 (*Heart Circ. Physiol.* 45): H1098–H1102, 1999.
152. S.P.C. COLE, G. Bhardwaj, J.H. Gerlach, J.E. Mackie, C.E. Grant, K.C. Almquist, A.J. STEWART, E.U. Kurz, A.M.V. Duncan, G.R. Deeley, Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line, *Science* 258 (1992) 1650^1654.
153. SALEH A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 1998;115:200–209. *Biol* 2000;2:476–483.
154. SALO, D.C., DONOVAN, C. M. AND DAVIES, K.J. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic. Biol. Med.* **11**:239-246. 1991.

155. SAMELMAN, T.R. Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. *Exp Physiol.* **85**(1): 92-102. 2000.
156. SANTORO, M. G.; AMICI, C.; ELIA, G.; BENEDETO, A.; GARACI, E. Inhibition of virus protein glycosylation as the mechanism of the antiviral action of prostaglandin A in Sendai virus-infected cells. *J. Gen. Virol.*, **70**:789-800, 1989b.
157. SANTORO, M. G.; GARACI, E.; AMICI, C. Prostaglandins with antiproliferative activity induce the synthesis of a heat shock protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:8407-11, 1989a.
158. SANTORO, M.G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*, **59**: 55-63. 2000.
159. SARGE KD, Murphy SP, Morimoto RI. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* 1993;13(3):1392–407.
160. SATHIRAKUL, K. Suzuki, H. Yamada, T. Kinetic analysis of hepatobiliary transport of organic anions in Eisai hyperbilirubinemic mutant rats. (1993) *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 268:65-73.
161. SCHAUB, J. Kartenbeck, J. Ko´nig, O. Vogel, R. Witzgall, W. Kriz, D. Keppler, J. *Am. Soc. Nephrol.* 8 (1997) 1213^ 1221.

162. SCHAUB, J. Kartenbeck, J. König, H. Spring, J. Dořsam, G. Staehler, S. Stořkel, W.F. Thon, D. Keppler, J. Am. Soc. Nephrol. 10 (1999) 1159-1169.
163. SCHUETZ JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, et al. MRP4: a previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med* 1999;5:1048-51.
164. SCHLESINGER, M.J. Heat shock proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **265** (21):12111 - 4, 1990.
165. SIES, H.; Summer K. H. Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver. *Eur. J. Biochem.* **57**:503-512; 1975.
166. SEELIG GF AND MEISTER A. Glutathione biosynthesis: γ -glutamylcysteine synthetase from rat kidney. *Methods Enzymol*
167. SIES, H. (1985) *Oxidative Stress*, Academic Press, London.
168. SIES, H. Intracellular effects of glutathione conjugates and their transport from the cell. In: Sies, H.; Ketterer, B., eds., *Glutathione conjugation: mechanisms and biological significance*. London: Academic Press; 1988:175-192.
169. ŠTEFKOVÁ J, POLEDNE R, HUBAČEK JA ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res* 2004; **53**: 235-243.

170. SUGDEN PH, Bogoyevitch MA. Intracellular signalling through protein kinases in the heart. *Cardiovasc Res* 1995;30(4):478–92. *Gene Dev* 1996;10(21):2782–93.
171. TANIGUCHI, M. Wada, K. Kohno, T. Nakamura, T. Kawabe, M. Kawakami, K. Kagotani, K. Okumura, S. Akiyama, M. Kuwano, A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation, *Cancer Res.* 56 (1996) 4124–4129.
172. TAYLOR, R.P., HARRIS, M.B., STARNES, J.W. Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Am. J. Physiol.* **276**(3 Pt 2): H1098-102. 1999.
173. THOMAS, J.A., POLAND, B. & HONZATKO, R. (1995) Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch. Biochem. Biophys.* 319, 1–9
174. TOMASELLI GF AND MARBAN E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 42: 270–283, 1999.
175. VALEN G, Hansson GK, Dumitrescu A, Vaage J. Unstable angina activates myocardial heat shock protein 72, endothelial nitric oxide synthase, and transcription factors NFκB and AP-1. *Cardiovasc Res* 2000;47:49–56.
176. TUSNARDY, E. Bakos, A. Váradi, B. Sarkadi, Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters, *FEBS Lett.* 402 (1997) 1–3. cDNA, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 1310–1319.

177. VESELEY MJ; EXON DJ; CLARK JE; FORESTI R; GREEN CJ; MOTTERLINI R Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells; hemin and sodium nitroprusside are regulators *in vitro*. *Am J Physiol*; **275**(4 Pt1): C1087-94, 1998.
178. VIGH, L., MARESCA, B., AND HARWOOD, J.L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem. Sci.* **23**:369-374. 1998.
179. WELCH, W.J. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* **72**: 1063-1081. 1992.
180. WENDEL, A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, **77**:325-33, 1981.
181. XIA W, Voellmy R. Hyperphosphorylation of heat shock transcription factor 1 is correlated with transcriptional competence and slow dissociation of active factor trimers. *J Biol Chem* 1997;272(7):4094–102.
182. WESTWOOD JT, Clos J, Wu C. Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat-shock factor. *Nature* 1991;353(6347):822–7.
183. WICKENDEN AD, KAPRIELIAN R, KASSIRI Z, TSOPORIS JN, TSUSHIMA R, FISHMAN GI, AND BACKX PH. The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. *Cardiovasc Res* 37: 312–323, 1998.

184. YAMANE, Y.; Furuichi, M.; Song, R.; Van, N. T.; Mulcahy, R. T.; Ishikawa, T.; Kuo, M. T. Expression of multidrug resistance protein/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase genes is regulated by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **273**:31075– 31085; 1998.
185. YAMASHITA N, Baxter GF, Yellon DM. Exercise directly enhances myocardial tolerance to ischaemia–reperfusion injury in the rat through a protein kinase C mediated mechanism. *Heart* 2001;85(3): 331–6.
186. YAMASHITA N, Hoshida S, Nishida M, Igarashi J, Aoki K, Hori M, et al. Time course of tolerance to ischemia–reperfusion injury and induction of heat shock protein 72 by heat stress in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(7):1815–21.
187. YAO JA, JIANG M, FAN JS, ZHOU YY, AND TSENG GN. Heterogeneous regulating potassium channels in ventricular myocytes from rats with experimental heart failure (Abstract). *Pacing Clin Electrophysiol* 22: 746, 1999.
188. ZAMAN, G. J R. , et al (1994) *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 91:8822-8826.
189. ZIEGLER, D.M. (1985) Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 305±329.
190. ZOU J, Salminen WF, Roberts SM, Voellmy R. Correlation between glutathione oxidation and trimerization of heat shock factor 1, an early step in stress induction of the Hsp response. *Cell Stress Chaperones*. 1998 Jun;3(2):130-41.