

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

**RESPOSTA DAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (27, 60, 72
e 73) EM MÚSCULOS DE RATOS APÓS SESSÃO DE
EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA-MODERADA INTENSIDADE**

SÉRGIO PAULO DE TARSO DOMINGUES

**PIRACICABA - SP
2006**

**RESPOSTA DAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (27, 60, 72
e 73) EM MÚSCULOS DE RATOS APÓS SESSÃO DE
EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA-MODERADA INTENSIDADE**

SÉRGIO PAULO DE TARSO DOMINGUES

Orientadora Profa. Dra. ROZANGELA VERLENGIA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Metodista de Piracicaba, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Educação Física, na área de concentração em Performance Humana, sob orientação da Professora Dra. Rozangela Verlengia.

**PIRACICABA - SP
2006**

DEDICATÓRIA

Ao meu Pai Lázaro Domingues, por me proporcionar oportunidade na vida de buscar novos horizontes, apoiando-me e guiando-me por um caminho de Fé.

A minha mãe por ter me oferecido este novo mundo, assim possibilitando estas conquistas.

À minha esposa, Maria Débora, por me incentivar e colaborar nos momentos difíceis encontrados nesta busca.

À minha filha, Pamela, maravilhosa e compreensiva, que, com muita humildade, está galgando os degraus do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Rozangela Verlengia, pelo exemplo de professora e pesquisadora, por todos os ensinamentos ao longo destes dois anos de convivência e, sobretudo, pelo exemplo de conduta ética, profissional e de vida.

Ao Prof. Dr. João Paulo Borin, por confiar em meu potencial e me guiar na busca de orientação, e pelo conhecimento transmitido nas disciplinas ministradas.

As técnicas do laboratório de fisiologia e farmacologia da UNIMEP (Universidade Metodista de Piracicaba) Patrícia Carla Paulino Lelotto e Melissa Victo, por sempre contribuírem para um ótimo andamento dos experimentos e conhecimentos transmitidos.

À Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho, por me disponibilizar o laboratório do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do ICB da USP/SP.

À Profa. Dra. Luciana Chagas Caperutto, pela sua paciência e humildade no desenvolvimento deste trabalho, ensinando-me com a maior boa vontade e competência que uma pesquisadora pode ter.

À Profa. Dra. Silvana Aparecida Bordin da Silva, por me orientar e disponibilizar o Laboratório de Biologia Molecular, no Departamento de Fisiologia e Biofísica, do ICB da USP de São Paulo.

Aos amigos Marcelo Conte, que foi o grande incentivador desta nova fase em minha vida; Roberto Vazatta, pelas inúmeras vezes em que esteve disponível a me ajudar; e ao Luís Felipe Milano Teixeira, sem os quais não seria possível a conclusão desse trabalho. E a todos os amigos que, direta ou

indiretamente, contribuíram. Finalmente agradecer o suporte financeiro das agências de fomento para o desenvolvimento a pesquisa: FAP – Fundo de Apoio a Pesquisa da UNIMEP e a FAPESP – Fundo de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo e também ao Instituto Superior de Educação Uirapuru, que acreditou e me auxiliou nas despesas acadêmicas; sem esta ajuda seria impossível ter realizado este sonho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGREDECIMENTOS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	ix
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 <i>Proteínas de Choque Térmico – Heat Shock Protein (HSP).....</i>	3
2.2 <i>Família das Small HSPs.....</i>	8
2.3 <i>HSP 60.....</i>	9
2.4 <i>Família das HSP 70.....</i>	10
2.5 <i>HSP 90.....</i>	12
2.6 <i>Regulação gênica das HSps.....</i>	12
2.7 <i>HSPs e o Exercício físico</i>	14
3 – OBJETIVOS	15
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 <i>Animais.....</i>	16
4.2 <i>Protocolo de exercício.....</i>	16
4.3 <i>Obtenção das amostras biológicas.....</i>	17
4.4 <i>Análise das proteínas de choque térmico por Western Blotting.....</i>	18
4.4.1 <i>Obtenção das Proteínas Totais.....</i>	18

4.4.2 Separação eletroforética das proteínas.....	18
4.4.3 Quantificação das proteínas de choque térmico.....	18
4.5 Quantificação das Proteínas Totais	19
4.6 Estatística	19
5 – RESULTADOS	20
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXERCÍCIO.....	20
5.2 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DAS HSPs 27, 60, 72 E 73 NO	21
MÚSCULO GASTROCNÊMIO.....	
5.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DAS HSPs 27, 60, 72 E 73 NO	25
MÚSCULO SÓLEO.....	
6 – DISCUSSÃO.....	29
6.1 Análise das HSPs.....	29
7 - CONCLUSÃO.....	32
8 - RESULTADOS DE PRODUÇÃO COM O ESTUDO.....	33
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Regulação da resposta ao choque térmico.....	13
Figura 2	Concentrações de lactato sanguíneo.....	20
Figura 3	Determinação do conteúdo protéico da HSP 27 para o músculo gastrocnêmio.....	21
Figura 4	Determinação do conteúdo protéico da HSP 60 para o músculo gastrocnêmio.....	22
Figura 5	Determinação do conteúdo protéico da HSP 72 para o músculo gastrocnêmio.....	23
Figura 6	Determinação do conteúdo protéico da HSP 73 para o músculo gastrocnêmio.....	24
Figura 7	Determinação do conteúdo protéico da HSP 27 para o músculo sóleo.....	25
Figura 8	Determinação do conteúdo protéico da HSP 60 para o músculo sóleo.....	26
Figura 9	Determinação do conteúdo protéico da HSP 73 para o músculo sóleo.....	27
Figura 10	Determinação do conteúdo protéico da HSP 73 para o músculo sóleo.....	28

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

Anti-IgG	Anti- Imunoglobulina G
ECL	Electrogenerated chemiluminescent
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HRP	Peroxidase de Rábano Silvestre (em inglês - Horse Radish Peroxidase)
HSE	Elemento de Choque Térmico (em inglês - Heat Shock Element)
HSF	Fator de Choque Térmico (em inglês - Heat Shock Factor)
HSP	Proteínas de Choque Térmico – (em inglês - Heat Shock Protein)
kDa	quiloDalton
mmol	Milimolar
SDS - PAGE	Duodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida
TNF	Fator de necrose tumoral
BSA	Albumina sérica Bovina (em inglês – Bovine Serum Albumin)
GRP	Proteína regulatória de glicose (em inglês - Glucose regulated protein)
HSC	Proteína de estresse cognata (heat shock cognate)
H⁺	Íons de hidrogênio
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1	Fatores envolvidos na indução da HSP70 no músculo esquelético..	11
TABELA 1	Protocolo de resistência para indução da exaustão.....	17

RESUMO

As proteínas de choque térmico (HSP) são sintetizadas pelas células em resposta a várias condições de estresse, como, por exemplo, o exercício físico exaustivo. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o conteúdo protéico das HSPs 27, 60, 70 e 72 em diferentes períodos após sessão única de exercício (corrida) em esteira no músculo gastrocnêmio e sóleo de ratos. Para tal, 45 Ratos Wistar machos, com 90 dias de vida, foram submetidos a protocolo de exercício (baixa-moderada intensidade) em esteira com velocidade e inclinação final de 21m/min e 5°, respectivamente e sacrificados após 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas, após o término do exercício. A expressão das HSPs foi determinada por meio do uso da técnica de Western Blotting, utilizando anticorpos específicos. O software SCION IMAGE foi utilizado para leitura da densidade óptica dos espectros. Reduções de 62,39%; 45,27%; 53,01% foram observadas nos períodos 0, 1 e 2 horas após o término do exercício na síntese da HSP 60 no músculo gastrocnêmico. Por outro lado, o conteúdo das HSP 72,73 e 27 não apresentaram alterações estatisticamente significantes no conteúdo protéico. Em relação ao músculo sóleo, o conteúdo da HSP 60 aumento de 160,22% (4 horas) e 166,12% (72 horas) e a HSP72 184% (4 horas). Os dados sugerem que o exercício de Baixa-moderada intensidade pode promover alteração no conteúdo protéico das HSPs no músculo sóleo e gastrocnêmico.

Palavra chave: HSP, exercício físico e conteúdo protéico.

ABSTRACT

The Heat Shock Proteins (HSP) are synthesized by the cells in reply to some conditions of stress, as for example, the exhausting exercise. Of this form, the objective of the present study is to evaluate the expression of HSPs 27, 60, 70 and 72 in different periods after only session of exercise in treadmill in the rats soleo and gastrocnemic muscle. For such, 45 male Wistar Rats, with 90 days of life, had been submitted to the protocol of moderate low exercise in treadmill with speed and inclination final of 21m/min and 5° respectively and sacrificed after 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours after exercise. The protein content of the HSPs was determined through the use of the technique of Western Blotting, having used specific antibodies. Software SCIO IMAGE was used for reading of the optic density of the specters. Reductions for the 62,39%, 45,27% and 53,01% they had been observed in the periods 0, 1 and 2 after finish exercise in the synthesis of HSP60 gastrocnemic muscle. On the other hand, the content HSP72, 73 3 27 they had not presented significant statistics on the protein content. In relation to the soleo muscle the content HSP60 increase of the 160,22% (4 hours) and 166,12% (72 hours) the HSP72 184% (4 hours). The data suggest that the exercise of low moderate intensity can promote alteration in the protein content of the HSPs in muscle soleo and gastrocnemic.

Key words: HSP, exercise and protein content

1 – INTRODUÇÃO

A homeostasia celular é controlada por inúmeros mecanismos biológicos que tem como principal função manter o meio-interno. Alterações na homeostasia como a não regulação térmica e química pode resultar em um processo denominado desequilíbrio fisiológico.

Durante o exercício físico o organismo é submetido a um desequilíbrio devido à queda do pH, aumento da temperatura, alterações de resíduos metabólicos, aumento da demanda energética entre outros. Em resposta, mecanismos de defesa e reparo (hormonais, metabólicos, apoptóticos, imunológicos) são ativados.

O aumento do consumo de oxigênio (O_2) durante o esforço físico, induz o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Zoppi et al., 1993). Nesse sentido Jenkins & Goldfarb, (1993), verificaram que 2 a 5% do O_2 consumido dão origem a EROs no qual contribuem efetivamente para o desequilíbrio intracelular devido sua capacidade de oxidação lipídica podendo resultar em carbonilação protéica, danos no DNA e morte celular.

Os exercícios de intensidade moderada promovem uma demanda de O_2 menor em comparação aos exercícios intensos e desencadeiam um reduzido grau de estresse fisiológico devido ao melhor controle da homeostasia (produção e remoção do lactato em equilíbrio, remoção dos íons H^+ do NAD e FAD, níveis de pH toleráveis, respostas hormonais adequadas, manutenção da temperatura corporal, menor produção de EROs entre outros) (POWERS e HOWLEY, 2000).

Assim, compreender os mecanismos que levam ao desequilíbrio fisiológico, especificamente durante a atividade física, torna-se um ponto

importante para a prescrição e elaboração de um programa de exercícios físicos. Nesse contexto, as enzimas de choque térmico (HSP) possuem um papel relevante no mecanismo de reparo das células musculares em resposta a prática do exercício físico principalmente extenuante. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o conteúdo protéico (*Western-blotting*) das HSPs (73, 72, 60, 27) nos músculos sóleo e gastrocnêmico em diferentes períodos de tempo ao término de uma única sessão de exercício com intensidade baixa-moderada.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Proteínas de Choque Térmico – Heat Shock Protein (HSP)

Dentre os mecanismos de proteção desenvolvido ao longo do processo evolutivo frente ao estresse ambiental, têm-se a resposta ao choque térmico, também referida como resposta ao estresse (WELCH, 1992, LOCKE e NOBLE, 1995; FEHRENBACH e NIESS, 1999), promovida pelas proteínas denominadas de choque térmico (HSP) e/ou proteínas de estresse, que mantêm as suas estruturas íntegras sob tais condições, auxiliando na manutenção e formação correta de proteínas (INGLOLIA, 1980 e PELHAM, 1982). As HSPs estão presentes em quase todas as células eucarióticas (LINDQUIST, 1988). Lembrando que o primeiro a descrever o estresse foi Seyle em 1936, relacionando a resposta dos organismos a diversos estímulos externos (i.e., estresse), as quais geralmente desencadeiam uma série de eventos orgânicos que auxiliam na adaptação dos organismos (SANTORO, 2000). As HSPs foram descritas a partir das primeiras observações feitas por Ritossa em (1962), quando observou as células da glândula salivar de *Drosophila Buschii*. Segundo este autor, a submissão das larvas deste inseto a um choque térmico, correspondendo ao aumento de 25° para 30° na temperatura ambiente onde se desenvolvia a larva, por 30 minutos, determinava uma alteração do padrão de espessamento cromossomal. Como esses espessamentos ocorreram em locais de intensa atividade transcricional, a mudança de padrão evidenciava que o choque térmico havia ativado um conjunto de genes que determinavam à expressão de um grupo específico de proteínas. Ritossa, 1962 também demonstrou que a variação no padrão de espessamento cromossomal ocorria quando a temperatura atingia um valor de

limiar determinado, e não em resposta a qualquer variação brusca de temperatura (amplitude entre ± 5 a 6°C). Em células de mamíferos a síntese das HSPs não acontece somente pelo aumento da temperatura (WELCH, 1992; LOCKE e NOBLE, 1995), mas também por uma variedade de condições tóxicas sinalizadas pelo acúmulo de proteínas não-nativas, dentre estas temos:

- i) alterações do potencial de oxidação e redução no meio intracelular. Fato, este, demonstrado no trabalho de Khassaf (2001) que pesquisou em músculo esquelético de humanos a relação entre a presença de espécies reativas de oxigênio, enzimas antioxidantes (superóxido desmutase e a catalase), proteínas de choque térmico HSP60 e HSP70 e o exercício físico. Como resultado, foi observado que o músculo esquelético humano responde a uma única sessão de exercício aumentando a atividade da superóxido desmutase e do conteúdo das HSP após exercício submáximo, ii) a exposição a metais pesados, também tem sido descrita induzir a expressão das HSPs, quando não quelados favorecem a formação da espécie reativa do oxigênio (hidroxila) desencadeando o estresse oxidativo que por sua vez induzem as HSPs (FEIGE, 1996). Segundo, Feige *et al.*, 1996, os íons Cadmium (Cd^{2+}), Cobre (Cu^{2+}), Mercúrio (Hg^{2+}) e Zinco (Zn^{2+}) são exemplos destes metais pesados; iii) análogos de aminoácidos, que ao participarem do processo de síntese protéica podem promover a formação de proteínas não nativas e a terminação prematura da cadeia polipeptídica nascente ou erros na tradução (FEIGE, 1996); iv) no grupo das drogas citotóxicas encontramos um número relativo de hepatotóxicos como os bronobenzeno, os carbonos tetracloreto, clorofórmio, cocaína, que podem alterar a conformação espacial de algumas proteínas, v) em processos de resposta imunitária, tais como infecção viral,

bem como a presença de células cancerosas. Neste caso, tem sido sugerido que as proteínas de estresses, principalmente HSP 70, HSP90 e gp96 e HSP 60, age tanto como sinalizadoras de dano, bem como carregadoras de antígeno para a resposta imune (MOSELEY, 2000; MULTHOFF, 2006). O complexo proteína do estresse-antígeno (HSP-Ag), o qual é liberado na circulação após a morte da célula injuriada, são reconhecido e captada pelas células apresentadoras de antígenos, participando desta forma da ativação do sistema imune. Pode, também facilitar a transferência de antígenos peptídicos para moléculas do complexo de histocompatibilidade maior classe I (MHC-classe I), o qual pode expor o antígeno sobre a superfície das APCs com subseqüente ativação de linfócitos T citotóxicos (FEIGE, 1996; SANTORO, 2000; TSAN, 2004). Essas HSPs, também estimulam tanto macrófagos quanto linfócitos T a secretar citocinas inflamatórias, conforme foi observado no trabalho realizado por Chen et al. (1999), que demonstrou que a exposição de macrófagos humanos e de camundongos a HSP 60 resultou na produção de IL-12; IL15 e TNF- α . Em adição, Todryk et al. (1999), mostrou que linfócitos T exposto a HSP 70 em meio extracelular induziu citocinas do perfil de resposta imune citotóxica (Linfócito T auxiliar), tal como interferon-gama (INF- γ).

Outro mecanismo envolvido na modulação das HSP está relacionado à privação de glicose, influxo de cálcio ou agentes que perturbem a glicólise na células, fato este observado em todas as células que se encontram em privação de oxigênio (hipoxia) ou de glicose, características estas observáveis em células tumorais (WANG, et al, 2007).

Muitos destes agentes estressantes têm em comum a capacidade de afetarem de modo adverso à conformação correta das proteínas e, conseqüentemente, a sua função (MINOWADA, 1995).

Os agentes estressores envolvidos na alteração da expressão das HSPs foram estudados isoladamente e incluem temperatura elevada (LOCKE *et al*, 1990; SKIDMORE *et al*, 1995 e HARRIS e STARNES, 2001), estresse metabólico, (BECKMANN *et al*, 1992 e FEBBRAIO e KOUKOULAS, 2000), hipóxia/isquemia (MESTRIL *et al*, 1994), secreção de catecolaminas (CHIN *et al*, 1996 e PAROO *et al*, 1999), aumento do cálcio intracelular (KIANG, *et al*, 1994) e espécie reativas do oxigênio (ZOU *et al*, 1998).

Apesar da presença das HSPs terem sido inicialmente interpretadas como um sinal para a detecção de estresse fisiológico, está bem estabelecido, agora, que a indução é fundamental para o processo de reparo gerados frente a diferentes tipos de danos, dentre os mecanismos de ação e ainda age na prevenção contra a agregação e coagulação de proteínas não-nativas (SANTORO, 2000), o que constitui o principal mecanismo por meio do qual as HSP conferem citoproteção, evitando dobramentos e interações incorretas entre as proteínas.

Lembrando, que em condições de homeostasia celular, os segmentos predominantemente hidrofóbicos das cadeias polipeptídicas que permitem as proteínas o dobramento correto, localizam-se no interior da molécula, enquanto os segmentos hidrofílicos voltam-se para o exterior. Esta exposição possibilita a solubilidade das proteínas em meio aquoso e impede a formação de agregados que ocorreriam pela interação das partes hidrofóbicas de diferentes moléculas, assim sendo temos a formação das proteínas nativas, chamadas

desta forma por terem atingido sua conformação terciária (MEYER e DA SILVA, 1999).

Desta forma as, HSPs tem sido, em alguns casos, descritas por atuarem como chaperonas, referente ao auxílio as outra proteínas em seu processo de formação ou de preservação conforme citado anteriormente (LIU *et al*, 1997) .

O papel citoprotetor das HSP, tem sido extensivamente documentado (ZOU *et al*, 1998; FEHRENBACH e NIESS, 1999; THIMOTHY, 2002) tanto *in vitro* como *in vivo*, em uma variedade de doenças humanas incluindo: distúrbios metabólicos, inflamação, infecção e isquemia.

No tecido cardíaco, têm sido descrita desempenhar um papel central no restabelecimento da função cardíaca após lesão (isquemia miocárdica, trauma e hipertermia), conforme observado em estudos *in vitro* e/ou *in vivo* utilizando modelos animais. No caso da inflamação, as HSP protegem as células de mamíferos da citotoxicidade, induzindo a produção de pró-inflamatórios como fatores de necrose tumoral α e β (TNF- α e β), interleucinas (IL)-1, IL-6 e IL-12 (TSAN, 2004). Também foi demonstrado que a síntese destas suprime a expressão da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) (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 a diminuição da resposta inflamatória e prevenção da letalidade desta doença. A expressão aumentada de HSP também esta associada com a inibição da replicação viral durante infecções agudas (SANTORO, 2000).

As HSPs são classificadas de acordo com seu peso molecular, a saber: família das Small HSPs (8 – 27 kDa); HSP 60 (60 kDa); família das HSP 70 (70-75 kDa); HSP 90 (90 kDa), entre outras (LIU *et al*, 1999). Abaixo segue a descrição das HSPs mais bem caracterizada.

2.2 Família das Small HSPs

Possuem peso molecular entre 18 e 30 kDa são chamadas de pequenas HSPs (Small HSPs), sua expressão constitutiva, podem ser encontradas tanto no núcleo quanto no citoplasma, e funcionalmente estão envolvidas com a prevenção da desnaturação das proteínas e proteção contra possíveis interações impróprias das mesmas e na citoproteção frente à lesão e morte celular (THIMOTHY, 2002). 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 atuando na manutenção da função e estrutura da cromatina bem como na degradação de proteínas. Muitas proteínas intracelulares são, antes de serem degradadas, modificada pela adição da ubiquinina quando ligadas covalentemente (em resíduos de lisina). O aumento da ubiquinina após o estresse presumidamente, facilita o endereçamento e remoção de proteínas desnaturadas como consequência do evento estressante (VICART, 1998).

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 (BUKACH, 2005).

Tem sido demonstrado, que a HSP27 é expressa tanto em tecido muscular humano quanto de ratos. Ela se localiza no citosol em condição normais (concentrações relativamente baixas) e é translocada ao núcleo em condições de estresse, mostrando um aumento de expressão na ordem de 10 a 20 em relação a condição de repouso. As principais funções incluem a estabilização de microfilamentos e a transdução de sinal das citocinas (THOMPSON, 2002).

A HSP 27 também interage com os filamentos de actina e com sua modulação facilitando a sobrevivência das células em cultura (LANDRY e HUOT, 1999) fazendo uma ligação entre HSP 27 e o citoesqueleto da célula através do seu envolvimento com os filamentos de actina (OKAMOTO, 1999).

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 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 facilitar a renaturação da mesma. Por esta razão, a tipo "b" pode desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento das células musculares (THIMOTHY, 2002).

2.3 HSP 60

As HSP 60 possuem peso molecular de 60 kDA. 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 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 situação de estresse. Essa proteína é expressa constitutivamente em tecido muscular estriado e em outras células, em proporção ao conteúdo mitocôndrial, podendo ser aumentada após estimulação elétrica crônica. (CHENG, 1989; GUPTA, 2002; YASUHARU, 2002)

Facilitam a sinalização e remoção das proteínas desnaturadas, estabilizam os microfilamentos de actina do citoesqueleto e se relacionam com as citocinas sinalizadoras (HORWITZ, 1992; JAKOB *et al*, 1993; INAGUMA *et al*, 1996 e NEUFER e BENJAMIN, 1996; MOSELEY, 1997).

2.4 Família das HSP 70

Fazem parte deste grupo as HSPs com peso molecular de 72 kDa (HSP70 - induzível), 73 kDa (HSC (heat shock cognate) - constitutiva), induzidas pela temperatura e 75 kDa (denominada GRP 75), 78 kDa (denominada GRP 78), induzidas por meio dos baixos níveis de glicose (LIU *et al*, 1999). As HSPs 72 e 73 inicialmente eram chamadas de HSP70, estão localizadas tanto no citoplasma quanto no núcleo das células (HERENDEEN, 1979). A forma constitutiva (HSP73) é sintetizada em células não estressadas de mamíferos e somente é aumentada após episódios de estresse (CHONG, 1998). Enquanto a forma induzível apresenta níveis baixos em células não estressadas, quase não detectáveis, porém quando exposta ao estresse, aumenta rapidamente e em grande quantidade (DONATI, 1990).

As HSP72 e as HSP73 contribuem para a prevenção contra a agregação protéica, ajudam no desdobraimento de proteínas danificadas, assumem o

papel de chaperonas nos polipeptídeos nascentes dos ribossomos, auxiliam na remoção das proteínas danificadas e estão envolvidas na proteção celular frente a uma variedade de estresse (CHIANG, 1989; ANGELIDIS, 1991; CRAIG, 1991; WELCH, 1992; CYR, 1995; ZIETARA, 1995; LOCKE, 1997; MOSSER, 1997).

Existem evidências experimentais de que apenas músculos compostos por fibras do tipo I apresentam expressão constitutiva de HSP70; músculos de fibras mistas contêm HSPs constitutivas de acordo com a proporção de fibras do tipo I existentes. O nível aumentado de HSP70 constitutivas em fibras do tipo I relaciona-se, possivelmente, ao fato destas fibras estarem continuamente sujeitas a condições mais estressantes do que outros tipos de fibras (LOCKE *et al.*, 1990).

Vários são fatores envolvidos na modulação da expressão da HSP-70 no músculo esquelético (Quadro 1).

Quadro 1: Fatores envolvidos na indução da HSP70 no músculo esquelético:

Exercícios e a relação do estresse com as contrações musculares	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Acúmulo de Ca²⁺ ✓ Acoplamento elétrico-mecânico ✓ Estresse ou filamentos intermediários ✓ Depleção do glicogênio ✓ Depleção do ATP ✓ Acidose e acúmulo de lactato ✓ Espécies reativas do oxigênio
Metabolismo e a relação com mensageiros	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hormônio: Cortisol ✓ Citocinas: IL-6 e TNF-alfa
Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hipertermia e hipotermia

Fonte: Liu, Y.; Gampert, L.; Nething, K.; Steinacker, J.M. Response and Function of skeletal muscle heat shock protein 70, *Front. Biosc.*, 11: 2802-2827, 2006.

2.5 HSP 90

As HSP 90, possuem peso molecular de 90 kDa, são constitutivas e estão no citoplasma, núcleo e no retículo endoplasmático de todas as células eucarióticas, sua família é composta por 3 subtipos: duas relacionadas a isoformas citoplasmática α (induzível/ forma mais importante) e β (constitutiva/ forma menos importante e uma proteína regulatória de glicose (GRP94) encontrada no retículo endoplasmático e na matriz mitocondrial. Outra importante atividade é a sua ligação com hormônios esteróides, incluindo os receptores de estrógeno, progesterona e glicocorticóides e andrógenos, participando da regulação destes receptores, onde na falta do hormônio ele se fixa a eles inativando-os. (ZHU, 2001). As HSP90 podem se envolver com outras HSPs ligadas diretamente com a tubulina e actina, componentes do citoesqueleto dos eucariotos. Cambiazo *et al.* (1999) sugeriram que, em relação as isoformas de HSP90 e as interações com o citoesqueleto a isoforma β é a principal proteína de interação com os microtúbulos em relação a isoforma α .

2.6 Regulação gênica das HSPs

Em células eucarióticas, a regulação da transcrição dos genes HSP tem sido estudado em resposta ao calor. O processo requer a ativação e translocação, para o núcleo, de uma proteína transregulatória, denominada de fator de choque térmico (em inglês - heat shock factor - HSF), que reconhece e liga-se a uma sequência de elementos, localizada na região promotora do gene HSP, denominada elemento de choque térmico (em inglês - heat shock element - HSE) deflagrando o processo de transcrição (MEYER, 1995;

SANTORO, 2000). 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 de GAA não-consecutivos. É possível que interações HSF DNA ativas impliquem no dobramento dos sítios de ligação e que a presença de múltiplos pontos de contato seja pré-requisito para que o fator induza tal dobramento (AMIN *et al*, 1988) (Figura 1). Em mamíferos, na região promotora dos genes das HSP70 e HSP90, o HSE é composto por cinco e seis unidades pentaméricas, respectivamente, em estreita proximidade com elementos basais promotores (SANTORO, 2000). Enquanto um único tipo de HSF foi descrito em fungos e em *Drosophila*, vários HSF foram identificados em plantas e vertebrados. A presença de diferentes HSFs na maioria dos eucariotos sugere que a interação entre eles pode ser importante para proteger organismos complexos das diversas forma de alterações ambientais (SANTORO, 2000) (Figura 1).

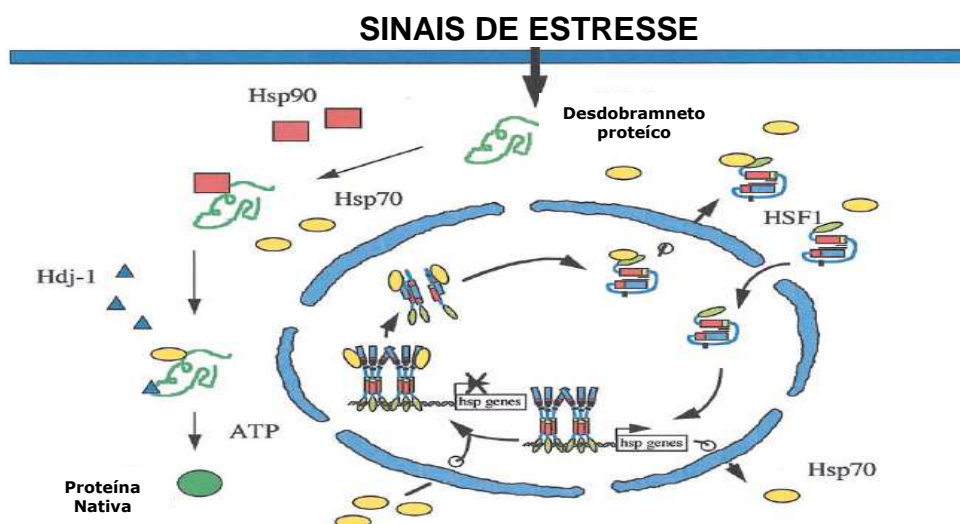


Figura 1. Esquema representação do mecanismo de ativação da resposta da HSP. Adaptado de Santoro, 2000.

2.7 HSPs e o Exercício físico

Observa-se consenso entre vários pesquisadores que relacionam as lesões teciduais e celulares aos diferentes tipos de exercício (JACOBS *et al*, 1995; FRIDEN *et al*, 1988; 1999; KYPAROS *et al*, 2001; ZUMWALT, 2006). De qualquer forma, as lesões musculares esqueléticas (alterações morfofuncionais) acometem constantemente indivíduos sendo ainda mais freqüentes em atividades com grande número de ações excêntricas (DUARTE, 1993).

As lesões musculares podem ser entendidas como qualquer alteração que promova um funcionamento inadequado da célula muscular, seja ela morfológica ou histoquímica (FAULKNER, 1993). O primeiro nível de lesão é denominado microtraumatismo, que é um estresse local que não demonstra sintomas. Se essa lesão passa a ocorrer constantemente (efeito somativo), os sinais de dano tecidual começam a aparecer. As lesões deste tipo são denominadas, de forma geral, lesões por *overuse* (CLEBIS, 2001).

Embora não se conheçam com clareza os mecanismos que podem proporcionar as lesões musculares, possivelmente estas estão relacionadas com o desequilíbrio nas concentrações dos íons cálcio, aumento da temperatura, alterações do pH, aumento das EROs, de óxido nítrico, e a própria mecânica do movimento (FITTS, 1996).

Diversos estudos têm verificado a relação dos exercícios físicos agudos e crônicos na expressão das HSPs em resposta da lesão muscular (SMOLKA *et al*, 2000; NAITO *et al*, 2001; SCHNEIDER *et al*, 2002; DEMIREL *et al*, 2003; THOMPSON *et al*, 2003; ATALAY *et al*, 2004). Nesse contexto, as enzimas de choque térmico (HSP) têm mostrado um papel relevante no mecanismo de

reparo das células musculares em resposta a prática do exercício físico extenuante (PAULSEN *et al.*, 2007). No entanto, os efeitos dessas enzimas sobre exercícios de longa duração não tem sido muito estudado. Essa carência de pesquisas envolvendo as HSPs e exercício prolongado pode ser explicado em parte pelo reduzido efeito dessas enzimas em situações aeróbias de exercício em relação a atividades intensas (MORTON *et al.*, 2007). Uma das justificativas para isso seria que o maior gasto calórico durante atividade física intensa resulta num aumento da temperatura muscular devido a sua elevada atividade contrátil.

Aumentos dos níveis das HSP27 foram verificados depois de exercícios isotônicos com ênfase na fase excêntrica (VICART *et al.*, 1998). Também o estresse oxidativo e mecânicos produzidos durante o exercício são indutores do aumento da expressão da HSP27. Em relação ao estresse oxidativo, seu papel está bem estabelecido quanto à regulação da expressão das HSPs, já para o estresse mecânico são necessários mais estudos que elucidem melhor esse fenômeno (ATOMI, 1991).

3 - OBJETIVO

Determinar o conteúdo protéico das HSPs 27, 60, 72 e 73 nos músculos sóleo e gastrocnêmio de ratos após uma sessão de exercício agudo, até a exaustão, de baixa-moderada intensidade nos intervalos de tempos, imediato (0); 1; 2; 4; 8; 12; 24; 48 e 72 horas), pela técnica de *Western-Blotting*.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram usados 45 roedores *Wistars* machos, fornecidos pelo biotério da UNICAMP com 30 dias de vida e peso entre 120 e 150g, foram mantidos em gaiolas coletivas (5 em cada), ambiente com temperatura de 24°C e ciclo claro/escuro controlado de 12 horas. Os animais receberam água e ração comercial *ad libitum*, cuja dieta contém 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídios (NUVILAB CR1, NUVTAL Nutrientes LTDA, Curitiba, PR). Após os animais completarem 90 dias de vida e peso de 350 gramas, foram submetidos ao experimento (GOBATTO, *et al*, 2001). Este estudo integra parte do projeto temático intitulado “Caracterização da lesão muscular (apoptose ou necrose) no músculo de ratos frente ao exercício físico intenso e a resposta de defesa reparo” aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas I da Universidade de São Paulo (USP), sob o nº de 49/04.

4.2 Protocolo de exercício

Os animais foram adaptados para a manipulação e corrida em esteira antes do início do experimento. A adaptação consistia no animal andar na esteira com uma velocidade de 13m/min durante cinco minutos por um mês. Em seqüência os animais foram colocados na esteira com velocidade e inclinação progressiva até atingirem 21 m/min, permanecendo até a exaustão, momento em que os animais não conseguiam manter-se correndo. Para a caracterização da intensidade do exercício no momento da exaustão, o lactato sangüíneo foi determinado de acordo com o artigo de Gobatto *et al*, (2001). Para isso, 17 ratos foram submetidos ao protocolo de exercício proposto

(tabela 1), sendo coletadas amostras de sangue (25 μ L) imediatamente após a exaustão e 3, 5, 15 e 20 minutos do término do exercício. A concentração de lactato foi determinada utilizando o analisador de lactato YSI (modelo 1500 SPORT).

Tabela 1: Protocolo de exercício de resistência para indução da exaustão em ratos *Wistar*.

Período do exercício (min)	velocidade (m/min)	Inclinação (grau- %)
5	13	0
5	14	0
5	14	2.5
10	14	5
5	15	5
5	16	5
5	17	5
Exaustão	21	5

4.3 Obtenção das amostras biológicas

Para a obtenção dos músculos sóleo e gastrocnêmio, os ratos foram anestesiados com sódio thiopental (25 mg/kg, i.p.) e posteriormente sacrificados por meio de guilhotina. Grupos de cinco animais para cada intervalo de tempo após o final do exercício: imediato (0), 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. Cinco ratos que não realizaram exercício constituíram o grupo

controle, e foram sacrificados junto com os grupos exercitados. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento das análises.

4.4 Análise das proteínas de choque térmico por *Western Blotting*

4.4.1 Obtenção das proteínas totais

As amostras musculares foram colocadas em tampão de extração à 4° [1% Triton-X 100, 100 mM Tris (pH 7.4), 10 mM EDTA fosfato de sódio, 10 mM vanadato de sódio, 2 mM fenilmetilsulfonilfluorido, e 0.1 mg apronitina/mL], e homogeneizadas em Polytron PTA 20 s generator (modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments, Inc. Westbury NY) em máxima velocidade por 30 segundos. Em seguida os extratos foram centrifugados a 15.000g em 4° C por 20 minutos e ao sobrenadante foi acrescido o tampão de amostra Laemmili (Laemmili, 1970), na proporção 2:1 e guardado a -70° C até as análises.

4.4.2 Separação eletroforética das proteínas

As proteínas foram separadas por meio do sistema de eletroforese SDS – PAGE. Resumidamente, a partir da quantificação das proteínas totais (Item 4.5 do material e métodos) quantidades uniformes para cada grupo foram fervidas por 5 minutos em H₂O, para sua total desnaturação e posteriormente separada em diferentes concentrações de géis de poliacrilamida de acordo com o peso molecular das proteínas em análise. Para HSP27 e 73 o utilizado foi de 10% de bis-acrilamida e para HSP60 e 72 de 8% de bis-acrilamida.

4.4.3 Quantificação das proteínas de choque térmico

As proteínas imobilizadas nos géis foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpos específicos a saber: Anticorpo monoclonal Anti-Hsp60 de camundongos - Stressgen - Bioreagents - /Canada Victotia (YASUHARU, 2002); Anti-Hsp27 CT, anticorpo policlonal Anti-HSP27 de coelhos (UPSTATE - Lake Placid - NY) (DEMIREL, 2003); Anticorpo Policlonal Anti-HSP0 de coelhos (Stressgen - Bioreagents - /Canadá Victotia) (DEMIREL, 2003); Anticorpo Policlonal Anti-HSC70 de Ratos - Stressgen - Bioreagents - Victotia /Canadá (YASUHARU, 2002). Os anticorpos foram diluídos e bloqueados (3% BSA no lugar do leite desnatado) durante a noite em 4° C, foram lavados por 30 minutos tampão de bloqueio sem o leite. Para a detecção utilizou-se o sistema anti-IgG conjugada peroxidase de rabanete diluído 1:1000, exceto para HSP70; em que usou-se a IgG de coelho anti-rato conjugada HRP (Stressgen – Bioreagents - / Canadá Victoria), visualizado com sistema de detecção ECL. HRP-conjugated (Horse Radish Peroxidase) anti-IgG. Os anticorpos foram detectados por autoradiografia, usando filme fotográfico Kodak XAR film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY). As intensidades das bandas foram quantificadas através da leitura da autoradiografia com o programa Scion Image.

4.5 Quantificação das proteínas totais

Para a quantificação das proteínas totais, uma alíquota do sobrenadante, antes da adição do tampão Leammili (Item 4.4.2 do material e

métodos) foi retirada e analisada por meio do reagente BRADFORD – BioAgency – Biotecnologia – São Paulo/Brasil (BRADFORD, 1976).

4.6 – Estatística

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

5 - RESULTADOS:

5.1 Caracterização do protocolo de exercício

Na etapa de caracterização do protocolo de exercício, as concentrações de lactato sanguíneo apresentaram valores médios de $4,80 \pm 0,40$ mmol/L no momento da exaustão, sendo a cinética de recuperação da lactacidemia considerada normal. Redução de 48% dos valores pós esforço foram observados após 20 minutos do término do protocolo de corrida (Figura 2). O valor de lactato sanguíneo em repouso foi de $1,97 \pm 0,08$ mmol/L.

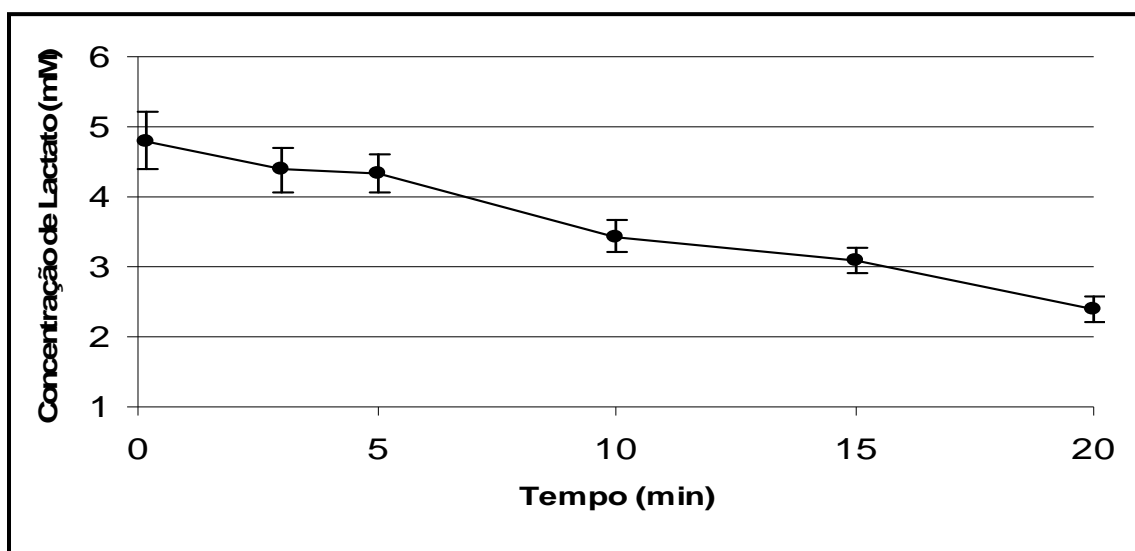


Figura 2 – Cinética da concentração do lactato sanguíneo obtidos nos períodos Imediato, 3, 5, 10, 15 e 20 minutos após o término do protocolo de exercício proposto (Tabela 1). Os valores são apresentados como média \pm Erro Padrão (EP) de três determinações

5.2 Determinação do conteúdo de proteínas HSP27, HSP60, HSP70 e HSP72 no músculo Gastrocnêmio

Nas figuras 3, 4, 5 e 6 observam-se as expressões da síntese das HSPs 27, 60, 72 e 73 para o músculo gastrocnêmio. Reduções de 63% (0); 52% (1) e 53% (2h) com $p < 0,05$ foram observadas para a HSP 60 (Figura 4). Por outro lado, aumentos de 210% e 234% nos períodos de 4 e 72 horas, respectivamente, foram detectados para HSP 72 (Figura 5). Em relação à HSP 27 e HSP 73 nenhuma alteração significativa foi evidenciada (Figuras 3 e 6).

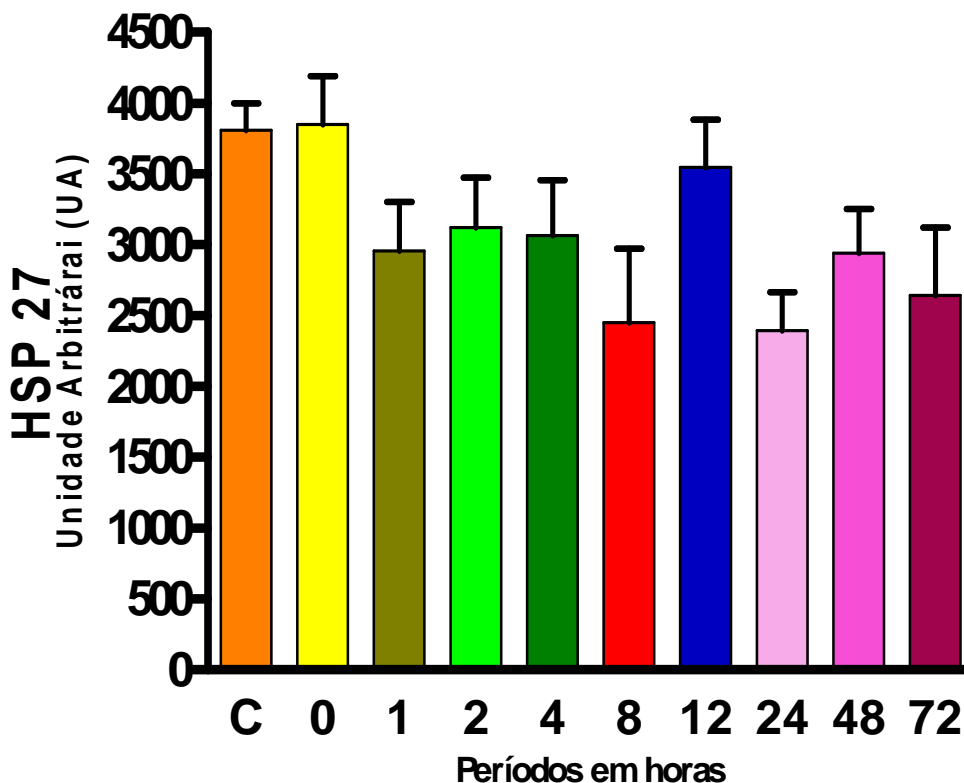


Figura 3: Efeito do exercício físico de baixa-moderada intensidade sobre o conteúdo protéico da HSP27 no músculo gastrocnêmio, obtidos em diferentes períodos após a exaustão: imediato, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. A análise foi realizada por *Western Blotting* conforme descrito no material e métodos item 4.4.2. Os valores são apresentados como \pm SEM de dois experimentos com $n=5$. * $P < 0.05$ para comparações com o grupo controle.

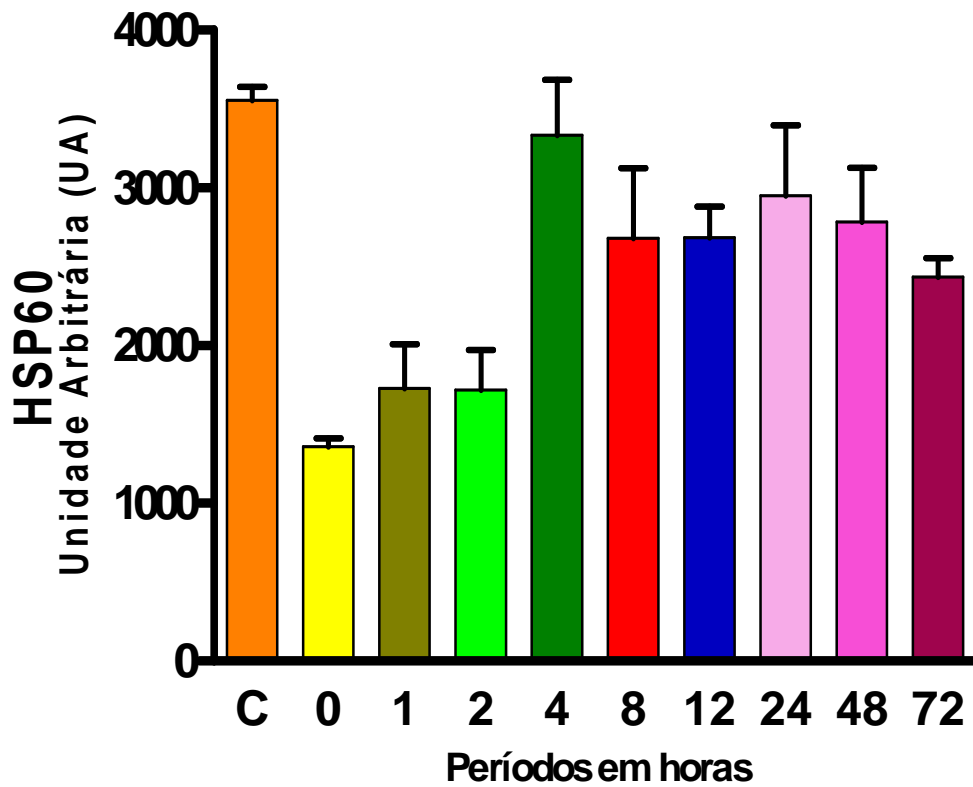


Figura 4: Efeito do exercício físico de baixa-moderada intensidade sobre o conteúdo protéico da HSP60 no músculo gastrocnêmio, obtidos em diferentes períodos após a exaustão: imediato, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. A análise foi realizada por *Western Blotting* conforme descrito no material e métodos item 4.4.2. Os valores são apresentados como \pm SEM de dois experimentos com $n=5$. * $P < 0.05$ para comparações com o grupo controle.

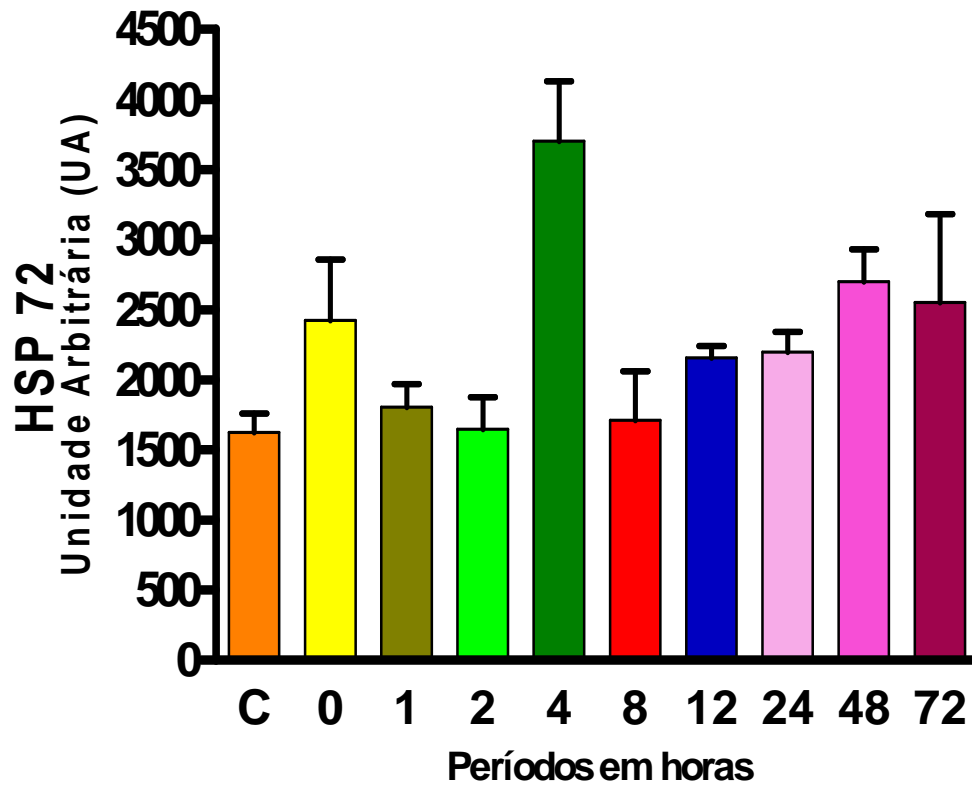


Figura 5: Efeito do exercício físico de baixa-moderada intensidade sobre o conteúdo protéico da HSP72 no músculo gastrocnêmio, obtidos em diferentes períodos após a exaustão: imediato, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. A análise foi realizada por *Western Blotting* conforme descrito no material e métodos item 4.4.2. Os valores são apresentados como \pm SEM de dois experimentos com $n=5$. * $P < 0.05$ para comparações com o grupo controle.

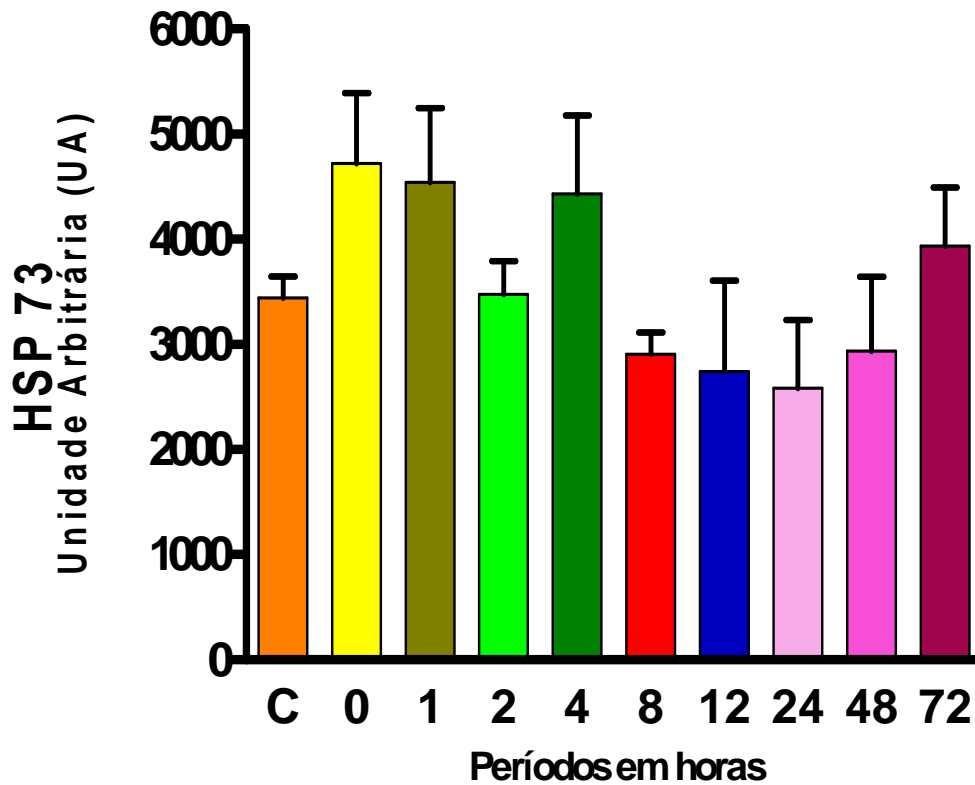


Figura 6: Efeito do exercício físico de baixa-moderada intensidade sobre o conteúdo protéico da HSP73 no músculo gastrocnêmio, obtidos em diferentes períodos após a exaustão: imediato, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. A análise foi realizada por *Western Blotting* conforme descrito no material e métodos item 4.4.2. Os valores são apresentados como \pm SEM de dois experimentos com $n=5$. * $P < 0.05$ para comparações com o grupo controle.

5.3 Determinação do conteúdo de proteína das HSP27, HSP60, HSP70 e HSP72 no músculo Sóleo.

Nas figuras 7, 8, 9 e 10 observam-se a expressão das HSPs 27,60,72 e 73 para o músculo sóleo ao longo do tempo pós exercício. Aumento 184% para o período 4 horas foram evidenciados para HSP 72 (figura 9) para os demais genes nenhuma alteração significativa foi observada (figura 7,8,10).

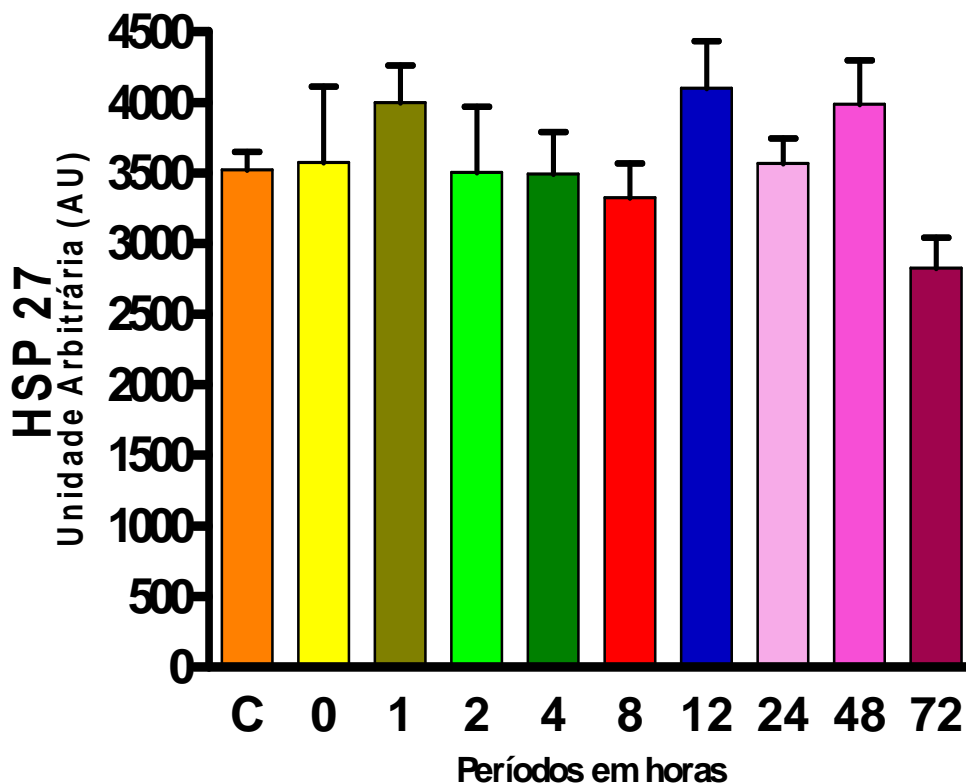


Figura 7: Efeito do exercício físico de baixa-moderada intensidade sobre o conteúdo protéico da HSP27 no músculo sóleo, obtidos em diferentes períodos após a exaustão: imediato, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. A análise foi realizada por *Western Blotting* conforme descrito no material e métodos item 4.4.2. Os valores são apresentados como \pm SEM de dois experimentos com $n=5$. * $P < 0.05$ para comparações com o grupo controle.

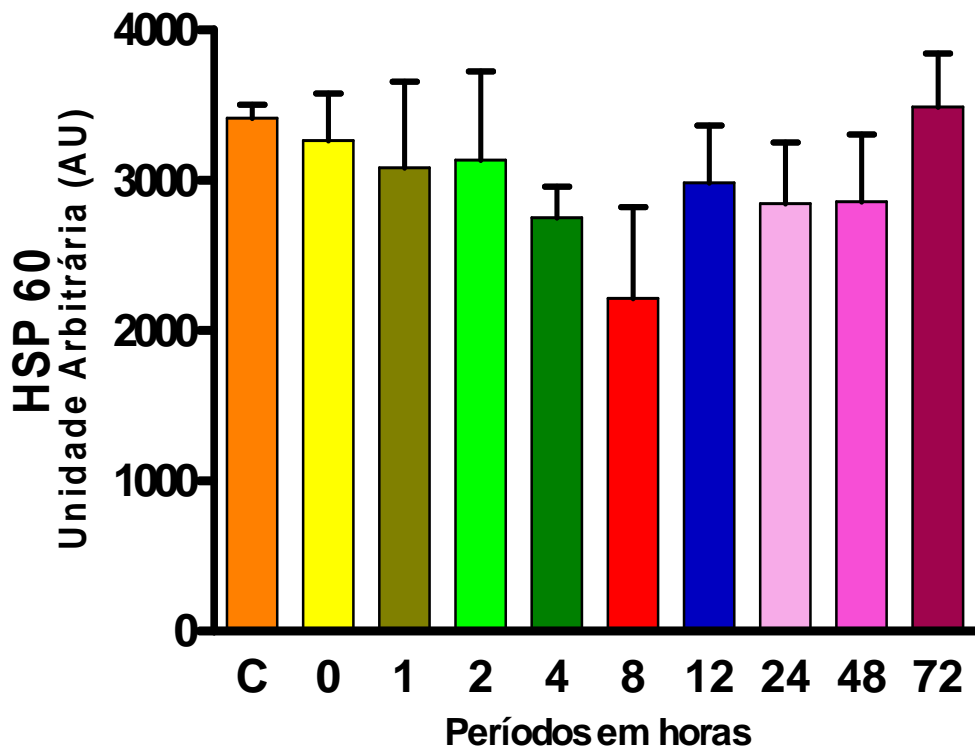


Figura 8: Efeito do exercício físico de baixa-moderada intensidade sobre o conteúdo protéico da HSP60 no músculo sóleo, obtidos em diferentes períodos após a exaustão: imediato, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. A análise foi realizada por *Western Blotting* conforme descrito no material e métodos item 4.4.2. Os valores são apresentados como \pm SEM de dois experimentos com $n=5$. * $P < 0.05$ para comparações com o grupo controle.

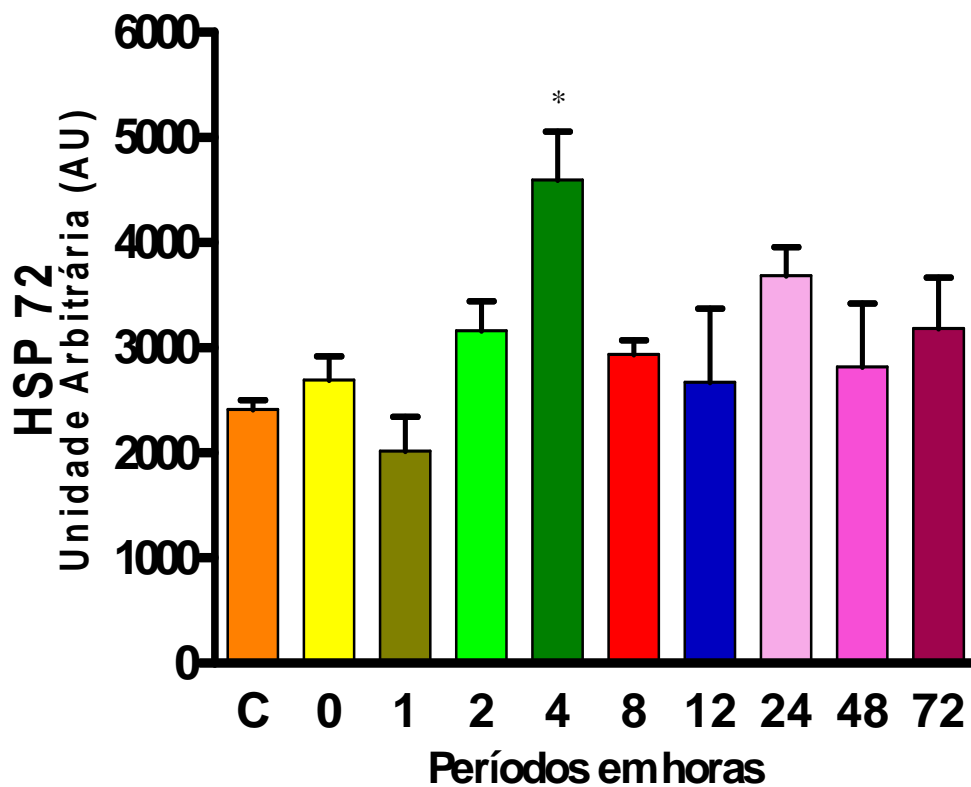


Figura 9: Efeito do exercício físico de baixa-moderada intensidade sobre o conteúdo protéico da HSP72 no músculo sóleo, obtidos em diferentes períodos após a exaustão: imediato, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. A análise foi realizada por *Western Blotting* conforme descrito no material e métodos item 4.4.2. Os valores são apresentados como \pm SEM de dois experimentos com $n=5$. * $P < 0.05$ para comparações com o grupo controle.

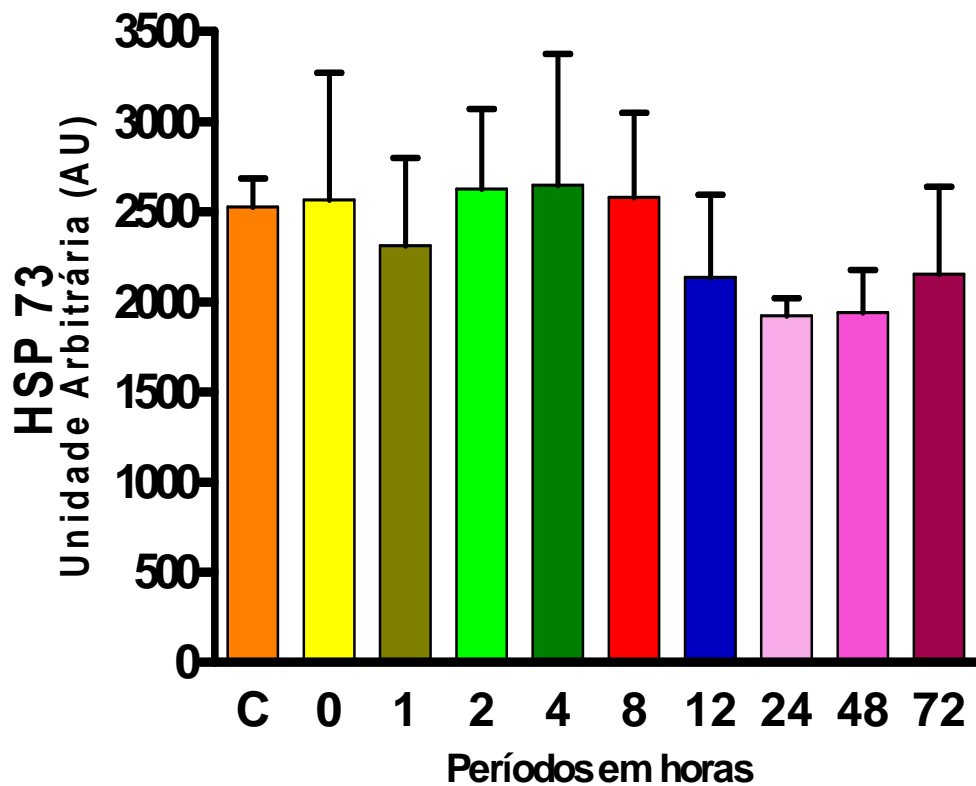


Figura 10: Efeito do exercício físico de baixa-moderada intensidade sobre o conteúdo protéico da HSP73 no músculo sóleo, obtidos em diferentes períodos após a exaustão: imediato, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. A análise foi realizada por *Western Blotting* conforme descrito no material e métodos item 4.4.2. Os valores são apresentados como \pm SEM de dois experimentos com $n=5$. * $P < 0.05$ para comparações com o grupo controle.

6 – DISCUSSÃO

A utilização de um protocolo exaustivo aeróbio foi aplicado especificamente para aumentar o consumo de oxigênio o qual está relacionado à formação de radicais livres e conseqüentemente a alterações tanto na atividade quanto na expressão das enzimas e proteínas associados ao mecanismo de defesa e reparo (JENKINS *et al*, 1993; ZOPPI *et al*, 2003). Devido à duração máxima do exercício aplicado (aproximadamente 45 min), a concentração de lactato não apresentou valores elevados em comparação a protocolos exaustivos anaeróbios (VOLTARELLI *et al*, 2002). Mesmo assim, os animais foram à exaustão demonstrando que uma pequena elevação na concentração de lactato em exercício aeróbio torna-se suficiente para diminuir o desempenho provavelmente por carência de substrato energético.

Das proteínas avaliadas somente as HSP 60 (Figura 4) e HSP 72 (Figuras 5 e 9) mostraram modulação após uma única sessão de exercício de – baixa-moderada intensidade.

A HSP60 esta presente em grande quantidade no citoplasma e mitocôndrias agindo como chaperonas, regulando e promovendo a sobrevivência das células por meio das propriedades protetora, reformadora e anti-apoptótica, demonstrando sua ação na manutenção da homeostase celular e da morte celular, depois de um exercício exaustivo (YASUHARU, 2002). Similar aos nossos resultados de redução da HSP60 no músculo gastrocnêmio, Gupta e Knowlton (2002), encontraram quando avaliaram por Western Blotting a HSP 60 em miócitos cardíacos após um período de indução de hipoxia e posterior reoxigenação, em ratos Sprague-Dawley, observaram uma redução para HSP60 citosólica, durante a reoxigenação em períodos de 10 e 24 horas

pós hipoxia, também verificou-se que este resultado se relacionava com a translocação da HSP60 para a membrana plasmática assumindo, desta forma, um o papel apoptótico, os autores também encontraram aumentos para a HSP72 no período de reoxigenação nos períodos de 10 e 24 horas pós-hipoxia aumentos semelhantes foram encontrados em nosso trabalho.

Melni e Noble (2002) encontraram resultados expressivos, quando compararam análises por Western Blotting e Elisa para HSP70 nos músculos vasto lateral e sóleo, frente diversas velocidades em esteira. Os resultados indicaram um rápido aumento desta entre as velocidades de 15 à 27 m/min com 2% de inclinação na esteira para o músculo sóleo. Nossos resultados foram semelhantes, considerando que em nosso trabalho foi avaliado a isoforma 72 kDA e no trabalho citado as análises referem-se a HSP 70, e demonstraram um aumento para o período de 4h (184%) (Figura 9) e depois deste período voltaram aos valores basais, provavelmente isto aconteceu por que o músculo sóleo é altamente recrutado durante a biomecânica da corrida como também é um músculo postural, tendo a predominância de fibras lentas (tipo 1), e possivelmente apresentem um alto nível de conteúdo protéico deste gene em seu estado basal (MELNI E NOBLE, 2002). Naito *et al* (2001) encontraram em seus experimentos diferenças no conteúdo protéico da HSP72 entre tipos de fibras musculares e a idade de ratos treinados e não treinados. Verificou-se que a idade não promove alterações na expressão da HSP72 na musculatura oxidativa (fibras lentas – músculo sóleo e porção vermelha do músculo gastrocnêmio) em contraste, comparando ratos jovens e velhos treinados, os níveis de HSP72 foram menores nos músculos glicolíticos (fibras rápidas - músculos plantar e porção branca do músculo gastrocnêmio)

nos ratos velhos treinados. Também concluem que os conteúdos presentes nas fibras de contração lentas são proporcionais nos ratos velhos e jovens treinados. E estas estão relacionadas com os exercícios aeróbios, que promovem maiores alterações na respiração celular (mitocôndrias) para a sustentação do exercício. Os resultados encontrados pelos autores para a HSP72 foram as seguintes: no músculo plantar e na porção branca do músculo gastrocnêmio (plantar – 94% e gastrocnêmio - 243%) que considerou que o exercício induz maiores aumentos da HSP72 no músculo esquelético, ligadas as fibras de contração rápidas (tipo IIb), não apresentando ligação ao conteúdo mitocondrial. Pode-se sugerir que havia um conteúdo maior de fibras do tipo IIb nas porções extraídas do músculo gastrocnêmio por nós, uma vez que não foi realizada a separação da porção branca e vermelha. Como resultado, os nossos dados demonstraram aumentos significativos para a HSP70, que é a forma induzível da família das proteínas de choque térmico com 70 kDa, para o músculo gastrocnêmio como para o sóleo. SMOLKA *et al.* (2000) encontraram em seu trabalho aumentos significativos para HSP72 após 2 horas do exercício exaustivo, e este aumento poderia se estender até 6 horas após o exercício, suportando a afirmação no fato do ataque das Espécies Reativas do Oxigênio (EROS) nas proteínas, devido ao estresse que foi submetido à célula. Deste modo, haveria a necessidade da síntese de mais proteínas e, assim sendo, um aumento na expressão das HSP72.

O trabalho de Milne e Noble (2000) indica que o exercício pode não proporcionar o estresse necessário para causar algum tipo de desequilíbrio fisiológico ou que a atividade tenha causado um estresse maior que o necessário, assim sendo talvez este fato possa explicar os resultados para os

genes que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Gastro - HSP27 – constitutiva/induzível e HSP72 – constitutiva e induzível e Sóleo HSP27 – constitutiva/induzível, HSP60 – constitutiva/induzível e HSP 73 – constitutiva). Outro ponto é o fato de que a expressão da HSP72 é dependente da duração e da intensidade do agente estressor (LOCKE *et al*, 1990; SKIDEMORE *et al*, 1995; LIU *et al*, 1999), desta forma a intensidade do exercício pode não ser suficientemente capaz de induzir a expressão deste gene no músculo esquelético (SALO *et al*, 1991).

Outras relações com o exercício físico podem ser realizadas, como investigações relacionando os sistemas energéticos e o sistema hormonal e as HSPs como também as relações de outras intensidades de exercícios com outras proteínas de choque térmico e seus fatores de indução.

7 - CONCLUSÕES

- 1) Devido à duração máxima do exercício aplicado (aproximadamente 45 min), a concentração de lactato não apresentou valores elevados em comparação a protocolos exaustivos anaeróbios.

- 2) O exercício de baixa-moderada intensidade promoveu alteração no conteúdo protéico das HSPs 60 e 72 no músculo sóleo.

- 3) O exercício de baixa-moderada intensidade promoveu HSP 72 para o músculo gastrocnêmio;

4) A intensidade de exercício aplicada não alterou os conteúdos protéicos das HSP27 e 73 para o músculo sóleo e HSP27 e 60 para o músculo gastrocnêmio.

8 – Resultado de produção com o estudo

8.1 Resumo enviado

Domingues, S.P.T.; Caperuto, L.C.; Carvalho, C.R.O.C.; Borges, E.; Teixeira, L.F.M.; Palanch, A.C.; Cavaglieri, C.R.; Verlengia, R. Proteínas de Choque Térmico HSPs 27, 60, 70 e 72: Análise da expressão no reparo da lesão muscular em ratos XXII Congresso Latinoamericano e 1º Iberoamericano de Ciências Fisiológicas. 2006. v. 2 (4), p. 223-224. ISSN 1669-5410. Buenos Aires. Argentina. 4 a 7 de novembro de 2006.

9. REFERÊNCIAS *

AMIM, J.; ANANTHAN, J.; VOELLMY, R. Key features of heat shock regulatory elements. **Mol. Cell. Biol.**, 8: 3761-3769, 1988.

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

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

ATOMI, Y.; YAMADA, S. and NISHIDA, T. Early changes of alpha b-crystallin mRNA in rat skeletal muscle to mechanical tension and denervation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 181: 1323-1330, 1991.

BECKMANN, R. P.; LOVETT, M.; WELCH, W. J. Examining the function and regulation of hsp 70 in cells subjected to metabolic stress. **J. Cell. Biol.**, 117, 1137-1150, 1992.

BENJAMIN I. J.; SHELTON, J.; GARRY, D. J. & RICHARDSON, J. A. Temporospatial expression of the small HSP/alpha B-crystallin in cardiac and skeletal muscle during mouse development. **Dev. Dyn.**, 208: 75-84, 1997.

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

BUKACH, O.V.; MARSTON, S.B.; GUSEV, N.B. Small heat shock protein with apparent molecular mass 20 kDa (Hsp20, HspB6) is not a genuine actin-binding protein. **J Muscle Res Cell Motil.**, 26(4-5):175-181, 2005.

CAMBIAZO, V., GONZALES, M., ISAMIT, C. and MACCIONI, R.B. The beta-isoform of heat shock protein hsp-90 is structurally related with human microtubule-interacting protein Mip-90. **Febbs Lett.**, 457: 343-347, 1999.

CHEN, W.; SYLDATH, U.; BELLMANN, K.; BURKART, V.; KOLB, H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. **J. Immunol.**, 162(60): 3212-3219.

CHENG, M. Y.; HARTL, F. U.; MARTIN, J.; POLLOCK, R. A.; KALOUSEK, F.; NEUPERT, W.; HALLBERG, E. M.; HALLBERG, R. L. & HORWICH, A. L. Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast. **Science**, 337: 620-625, 1989.

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

CHIN, J. H.; OKAZAKI, M.; HU, Z. W.; MILLER, J. W.; HOFFMAN, B. B. Activation of heat shock protein (hsp)70 and proto-oncogene expression by alpha1 adrenergic agonist in rat aorta with age. **J. Clin. Invest.**, 97: 2316-2323, 1996.

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

CLEBIS, N.K., NATALI, M.J.M. Lesões musculares provocadas por exercícios excêntricos. **Rev. Bras. Ciên. e Mov.**, 9 (4): 47-53, 2001.

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

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

DEMIREL, H. A.; HAMILTON, K. L.; SHANELY, R. A.; TUMER, N.; KOROLY, M. J.; POWERS S. K. Age and attenuation of exercise-induced myocardial HSP72 accumulation. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, 285 (4): H1609-15, 2003.

DONATI, Y. R. Y.; SLOSMAN, D. O.; POLLA, B. S. Oxidative injury and the heat shock response. **Biochim. Pharmacol.**, 40: 2571-2577, 1990.

DUARTE, J. A. R. **Lesões celulares do músculo esquelético induzidas pelo exercício físico**. Dissertação de Doutorado em Ciências do Desporto, especialidade Biologia do Esporte, Porto: Faculdades de Ciências do Desporto, Universidade do Porto, 1993.

FAULKNER, J. A.; BROOCKS, S.V.; OPTECK, J.A. Injury to skeletal muscle fiber during contraction condition of occurrence and prevention. **Phys. Ther.** 73 (12): 911-921, 1993.

FEBBRAIO, M. A.; KOUKOULAS, I. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. **J. Appl. Phys.**, 89: 1055-1060, 2000.

FEHRENDACH, E.; NIESS, A. M. Role of heat shock protein in the exercise response. **Exer. Immunol. Rev.**, 5: 57-77, 1999.

FEIGE, U., MORIMOTO, R. I., YAHARA, I. e POLLA, B. S. (1996). **Stress Inducible Cellular Responses**. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser.

FITTS, R.H. Muscle fatigue: the cellular aspects. **Am. Journal of Sport Med.**, 24 (6): 9-13, 1996.

FRIDEN, J.; LIEBER, R. L. Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 24(5): 521-30, 1992.

FRIDEN, J.; SEGER, J.; EKBLÖM, B. Sublethal muscle fibre injuries after high-tension anaerobic exercise. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup.**, 57: 360-8, 1988.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R.; SANTOS, L. A.; KOKOBUM, E. Maximal lactate steady state in rats submitted in swimming exercise. **Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.**, 130 (1): 21-27, 2001.

GUPTA, S; KNOWLTON, A.A. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia , and apoptosis. **Circulation**, 106: 2727-2733, 2002.

HARRIS, M. B.; STARNES, J. W. Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, 280: 2271-2280, 2001.

HERENDEEN, S. L.; VAN BOGELEN, R.A. and NEIDHARDT, F. C. Levels of major protein of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. **J. Bacteriol.**, 132: 255-258, 1979.

HORWITZ, J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 89: 10449-10453, 1992.

INAGUMA, Y.; HASEGAWA, K.; KATO, K.; NISHIDA, Y. cDNA cloning of a 20-kDa protein (p20) highly homologous to small heat shock proteins: developmental and physiological changes in rat hindlimb muscles. **Gene**, 178: 145-150, 1996.

INGOLIA, T. D.; CRAIG, E. A.; McCARTY. Sequence of three copies of the gene for the major Drosophila heat shock induced protein and their flanking regions. **Cells**, 21: 669-676, 1980.

JACOBS, S. C.; WOKKE, J. H.; BAR, P. R.; BOOTSMAN, A. L. Satellite cell activation after muscle damage in young and adult rats. **Anat. Rec.**, 242 (3): 329-336, 1995.

JAKOB, U.; GAESTEL, M.; ENGEL, K.; BUCHNER, J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. **J. Biol. Chem.**, 268: 1517-1520, 1993.

JENKINS, R.R.; GOLDFARB, A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 25: 210-212, 1993.

KHASSAF, M.; CHILD, R.B.; MCARDLE, A., BRODIE, D.A.; ESANU, C.; JACKSON, J.A. Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. **J. Appl. Physiol.**, 90: 1031-1035, 2001.

KIANG, J. G.; CARR, F. E.; BURNS, M. R.; MCCLAIN, D. E. HSP-72 synthesis is promoted by increase in $[Ca^{2+}]_i$ or activation of G proteins but not pHi or cAMP. **Am. J. Physiol.**, 267: C104-C114, 1994.

KYPAROS, A.; MATZIARI, C.; ALBANI, M.; ARSOS, G.; DELIGIANNIS, A. A decrease in soleus muscle force generation in rats after downhill running. **Can. J. Appl. Physiol.**, 26(4): 323-335, 2001.

LANDRY, J.; HUOT, J. Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by signaling pathway involving p38n MAP kinase and heat shock protein 27. **Biochem. Cell. Biol.**, 73: 703-707, 1995.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock protein. **Annu. Rev. Genet.**, 22: 631-677, 1988.

LIU, Y.; GAMPERT, L.; NETHING, K.; STEINACKER, J.M. Response and function of skeletal muscle heat shock protein 70. **Front. Biosci.**, 11: 2802-2827, 2006.

LIU, Y.; MAYR, S.; OPITZ-GRESS, A. Human Skeletal muscle HSP70 response to training in highly trained rowers. **J. Appl. Phys.** 86:101-104, 1999.

LOCKE, M. The cellular stress response to exercise: role of stress protein. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, 25: 105-136, 1997.

LOCKE, M.; NOBLE, E. G. Stress proteins: The exercise response. **Can. J. Appl. Physiol.**, 20(2): 155-167, 1995.

LOCKE, M.; NOBLE, E. G.; ATKINSON, B. G. Exercising mammals synthesize stress proteins. **Am. J. Physiol.**, 258: C723–C729, 1990.

MESTRIL, R.; CHI, S. C.; SAYEN, M. R.; DILLMANN, W. H. Isolation of a novel inducible rat heat-shock protein (HSP70) gene and its expression during ischaemia/hypoxia and heat shock. **Biochem. J.**, 298: 561-569, 1994.

MEYER, J.; KARTEMBECK, M.; BUCHELR, 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.**, 131:137-150, 1995.

MEYER, T.N.; DA SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Rev. Med. Brasil**, 45 (2): 181-188, 1999.

MILNE, K.J.; NOBLE, E.G.. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. **J. Appl. Physiol.**, 93: 561-568, 2002.

MINOWADA, G.; WELCH, W. I. Clinical implications of the stress response. **J. Clin. Invest.**, 95: 3-12, 1995.

MORTON, J.P.; MACLAREN, D.P.; CABLE, N.T.; CAMPBELL, I.T.; EVANS, L.; BONGERS, T.; GRIFFITHS, R.D.; KAYANI, A.C.; MCARDLE, A.; DRUST, B. Elevated core and muscle temperature to levels comparable to exercise do not increase heat shock protein content of skeletal muscle of physically active men. **Acta. Physiol.**, 2007, [Epub ahead of print].

MOSELEY, P. L. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. **J. Appl. Physiol.**, 83: 1413-1417, 1997.

MOSELEY, P. Stress proteins and the immune response. **Immunopharmacology**, 48: 299-302, 2000.

MOSSER, D.; CARON, A.; BOURGET, L.; DENIS-LAROSE, C. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. **Mol. Cell Biol.**, 17: 5317-5327, 1997.

MULTHOFF, G. Heat shock proteins in immunity. **Handb Exp Pharmacol.**, 172: 279-304, 2006.

NAITO, H.; POWERS, S. K.; DEMIREL, H. A.; AOKI, J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 33 (5): 729-34, 2001.

NEUFER, P. D.; BENJAMIN, I. J. Differential expression of α B-crystallin and HSP27 in skeletal muscle during continuous contractive activity: Relationship to myogenic regulatory factors. **J. Biol. Chem.**, 271:24089-24095, 1996.

NIESS, A. M.; DICKHUTH, H. H. Free radical and oxidative stress in exercise – Immunological aspects. **Exer. Immunol. Rev.**, 5:22-26, 1999.

OKAMOTO, C.T. HSP27 and signaling to the actin cytoskeleton Focus on "HSP27 expression regulates CCK-induced changes of the actin cytoskeleton in CHO-CCK-A cells". **Am. J. Physiol.**, 277 (6 Parte1): C1029-C1031, 1999.

PAROO, Z.; NOBLE, E. G. Isoproterenol potentiates exercise-induction of Hsp70 in cardiac and skeletal muscle. **Cell Stress Chaperones**, 4:199-204, 1999.

PAULSEN, G.; VISSING, K.; KALHOVDE, J.M.; UGELSTAD, I.; BAYER, M.L.; KADI, F.; SCHJERLING, P.; HALLÉN, J.; RAASTAD, T. Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 2007 [Epub ahead of print].

PELHAM, H. R. A regulatory upstream promoter element in *Drosophila* Hsp70 heat shock gene. **Cell.**, 30:517-528, 1982.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. **Fisiologia do exercício : teoria e aplicação do condicionamento e ao desempenho**. São Paulo:Manole, 2000.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, 13:571-573, 1962.

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

SANTORO, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochem. Pharmacol.**, 59:55-63, 2000.

SCHNEIDER, E. M.; NIESS, A. M.; LORENZ, I.; NORTHOFF, H.; FEHRENBACH, E. Inducible hsp70 expression analysis after heat and physical exercise: transcriptional, protein expression, and subcellular localization. **Ann. N. Y. Acad. Sc.**, 973:8-12, 2002.

SKIDMORE, R.; GUTIERREZ, J. A.; GUERREIRO, V. J.R.; KREGEL, K. C. HSP70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. **Am. J. Physiol.**, 268:92-97, 1995.

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

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

TIMOTHY, J. K. Do small heat shock protein protect skeletal muscle from injury? **Exerc. Sport. Sci. Rev.**, 30:(3) 117-121, 2002.

TODRYK, S.; MELCHER, A.A.; HARDWICK, N.; LINARDAKIS, E.; BATEMAN, A.; COLOMBO, M.P.; STOPPACCIARO, A.; VILE, R.G. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. **J. Immunol.**, 163(3):1398-1408, 1999.

TSAN, M.F.; GAO, B. Cytokine function and Heat Shock Proteien. **Am. J. Physiol.**, 286:c739-c744, 2004.

VICART, P.; CARON, A.; GUINCHENEY, P.; LI, Z.; PREVOST, M. C.; FAURE, A. A missence mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related mioparthy. **Nat. Genet.**, 20:92-95, 1998.

VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; DE MELLO, M.A. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 35(11):1389-1394, 2002.

WANG, H.Q.; DU, Z.X.; ZHANG, H.Y.; GAO, D.X. Different induction of GRP78 and CHOP as a predictor of sensitivity to proteasome inhibitors in thyroid cancer cells. **Endocrinology**, 148(7): 3258-3270, 2007.

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

YASUHARU, O.; KOUHACHI, T.; HISAHIRO, M.; AKIHIKO, I.; YOSHINOBU, O.; ROLAND, R. R. Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature. **J. Appl. Physiol.**, 92:1097-1103, 2002.

ZHU, F.G; PISETSKY, D.S.. Role of the Heat Shock Protein 90 in Immune Response Stimulation by Bacterial DNA and Synthetic Oligonucleotides. **Infect. Immun.**, 69(9):5546–5552, 2001.

ZIETARA, M.; SKORKOWSKI, E. Thermostability of lactate deshydrogenase LDH-A4isozyme: effect of heat shock protein DnaK on the enzyme activity. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, 27:1169-1174, 1995.

ZOPPI, C. C. ; ANTUNES NETO, Joaquim Maria Ferreira ; CATANHO, F. O. ; GOULART, L. F. ; MOURA, N. M. E. ; MACEDO, D. V. Alterações em Biomarcadores de Estresse oxidativo, Defesa Antioxidante e Lesão Muscular em Jogadores de Futebol durante uma Temporada Competitiva. **Revista Paulista de Educação Física**, 17 (2):119-130, 2003.

ZOU, J.; SALMINEN, W. F.; ROBERTS, S. M.; 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**, 3:130-141, 1998.

ZUMWALT, A. The effect of endurance exercise on the morphology of muscle attachment sites. **J. Exp. Biol.**, 209 (3):444-454, 2006.