TÁBATA LEAL NASCIMENTO

**PAPEL DA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70 INDUZÍVEL (HSP70) NA
ATROFIA MUSCULAR E SUBSEQUENTE RECUPERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

TÁBATA LEAL NASCIMENTO

**PAPEL DA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70 INDUZÍVEL (HSP70) NA
ATROFIA MUSCULAR E SUBSEQUENTE RECUPERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Profª Dra. Elen Haruka Miyabara

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Nascimento, Tábata Leal.

Papel da proteína de choque térmico 70 induzível (HSP70) na atrofia muscular e subsequente recuperação / Tábata Leal Nascimento. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Plasticidade Músculo esquelética.

Versão do título para o inglês: Role of inducible heat shock protein 70 (HSP70) in skeletal muscle atrophy and subsequent recovery.

1. Músculo esquelético 2. Atrofia muscular 3. HSP70
4. Célula satélite I. Miyabara, Profa. Dra. Elen Haruka II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0171/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Táбата Leal Nascimento.

Título da Dissertação: Papel da proteína de choque térmico 70 induzível (HSP70) na atrofia muscular e subsequente recuperação.

Orientador(a): Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **145** nas fls. **78** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Elen Haruka Miyabara, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Plasticidade muscular esquelética frente ao desuso** do qual participou(aram) o(s) alunos **Talita Cristiane Conte, Débora Cardoso Rodrigues, Lucila Hernandez da Silva, Lygia Samartin Gonçalves, Daniela Reis e o pesquisador Anselmo Sigari Moriscot**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **20.10.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 21 de outubro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. Ariel M.
Dpto. de Parasitologia
ICB - USP
asilber@usp.br

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL

Decl. CEUA.048/10

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 145/09/CEUA, datado de 20.10.09 e por solicitação da Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Tábata Leal Nascimento** ao projeto de pesquisa "*Plasticidade muscular esquelética frente ao desuso*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 03 de agosto de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador -CEUA- ICB/USP

À minha Mãe pelo apoio incondicional!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me capacitado e por nunca me deixar esquecer que está ao meu lado.

A minha família, Mãe, Carlos, Andressa, Arthur e Heitor por todo amor, apoio e incentivo.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Elen Haruka Miyabara por ter me proporcionado essa oportunidade e por tudo que tem me ensinado.

Aos meus companheiros de laboratório Lucila, Meiri, Débora, Marcelo, Eduardo, Thiago pela amizade, apoio, conselhos e companheirismo.

Ao Prof^o Anselmo Sigari Moriscot e toda sua equipe, por sempre disponibilizar o laboratório, materiais e equipamentos e por toda ajuda prestada.

Á Talita por todo incentivo e amizade.

Á Sarah, Lucila, Andressa, Samantha, Dani, Suzana, Maria, Mariana, Eliége, Letícia e Cris pela força e alegria proporcionada.

A toda minha família pelo apoio.

Aos meus amigos do ICB por todo o carinho e incentivo, especialmente equipe da Prof^a Cecilia.

A todos os professores do ICB que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho.

Ao Antônio por toda a assistência prestada.

A Rosana pela auxílio na realização da estatística deste trabalho.

A FAPESP pelo suporte Financeiro.

“Não basta dar os passos que nos devem levar um dia ao objetivo, cada passo deve ser ele próprio um objetivo em si mesmo, ao mesmo tempo em que nos leva para diante”.

Johann Goethe

RESUMO

Nascimento TL. Papel da proteína de choque térmico 70 induzível (HSP70) na atrofia muscular e subsequente recuperação. [Mestrado (Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

As proteínas de choque térmico exercem um papel regulatório chave na defesa celular. Com o intuito de investigar o papel da proteína de choque térmico 70 kDa induzível (HSP70) na atrofia muscular e subsequente recuperação, os músculos extensor longo dos dedos (EDL) e Sóleo (SOL) de camundongos transgênicos hiperexpressantes de HSP70 foram imobilizados durante 7 dias e subsequentemente liberados da imobilização e avaliados após 7 dias. A análise histológica mostrou que houve uma diminuição da área de secção transversal (AST) das fibras musculares do tipo I e II do músculo SOL e do tipo II no EDL em 7 dias de imobilização em ambos os animais selvagens (WT) e HSP70, porém, em 7 dias de recuperação, os músculos EDL e SOL dos animais HSP70 recuperaram a AST. O número de células satélites positivas para NCAM diminuiu após imobilização nos animais WT, porém permaneceu inalterado nos animais HSP70. Da mesma forma a contração tetânica máxima permaneceu inalterada nos animais HSP70. O aumento da expressão dos genes atrogin-1 e MuRF-1 induzido pela imobilização foi atenuado nos animais HSP70. Portanto, nossos dados sugerem que a HSP70 é importante para a melhor recuperação estrutural e funcional do músculo após imobilização, sendo que essa melhor recuperação pode estar relacionada à prevenção da quantidade de células satélites e à regulação dos genes chave para o processo de atrofia muscular.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Atrofia muscular. HSP70. Célula satélite.

ABSTRACT

Nascimento TL. Role of inducible Heat Shock Protein 70 (HSP70) in skeletal muscle atrophy and subsequent recovery [Master thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Heat shock proteins play a key regulatory role in cellular defense. To investigate the role of the inducible 70-kDa heat shock protein (HSP70) in skeletal muscle atrophy and subsequent recovery, extensor digitorum longus (EDL) and Soleo (SOL) muscles from overexpressing HSP70 transgenic mice were immobilized during 7 days and subsequently released from immobilization and evaluated after 7 days. Histological analysis showed that there was a decrease in cross-sectional area of type I and II myofiber from SOL and type II myofiber from EDL muscles at 7-day immobilization in both wild type and HSP70 mice. At 7-day recovery, EDL and SOL myofibers from HSP70 mice recovered their size. The number of NCAM positive-satellite cells reduced after immobilization and recovery in EDL muscles from wild type mice, but it was unchanged in the muscles from HSP70 mice. Muscle tetanic contraction was unaltered in all groups from HSP70 mice. In addition, the increase of atrogen-1 and MuRF-1 gene expression was attenuated in HSP70 mice. Therefore, our study suggests that the HSP70 is important for structural and functional recovery of muscles after immobilization and this effect might be associated with preservation of satellite cell amount and regulation of key elements in muscle atrophy.

Keywords: Skeletal muscle. Muscle atrophy. HSP70. Satellite cell.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Características gerais do tecido muscular esquelético.....	14
1.2 Plasticidade do músculo esquelético.....	16
1.3 Células Satélites.....	17
1.4 Atrofia do Músculo Esquelético.....	18
1.5 Características gerais das HSPs.....	23
1.6 HSP70 no músculo esquelético.....	24
1.5 Justificativa e relevância do estudo.....	27
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Animais.....	29
3.2 Grupos experimentais.....	29
3.2.1 Grupos experimentais para análise morfológica, funcional e expressão proteica.....	29
3.2.2 Grupos experimentais para análise de expressão gênica.....	30
3.3 Protocolo de imobilização.....	32
3.4 Western blot.....	32
3.5 Imunohistoquímica.....	33
3.6 Análise quantitativa e morfométrica	34
3.7 Contração muscular <i>in vitro</i>.....	34
3.8 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR em Tempo Real.....	35
3.9 Análise estatística.....	36
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Expressão da proteína HSP70.....	37
4.2 Peso Corporal e Muscular	37
4.3 Área de secção transversal.....	39
4.4 Células satélites.....	42
4.5 Contração tetânica máxima.....	44
4.6 Expressão dos genes Atrogin-1 e MuRF-1.....	44
5 DISCUSSÃO.....	47

6 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do tecido muscular esquelético

O músculo esquelético é o tecido mais abundante do corpo humano, corresponde de 40 a 60% de toda a massa corporal (Grefte et al., 2007; Karagounis, Hawley, 2010) e tem como funções principais a sustentação e movimentação coordenada do corpo, além de auxiliar na união das peças ósseas e na determinação de posições e postura do esqueleto (Bassel-Duby, Olson, 2006; Junqueira, Carneiro, 2008; Lieber, 2002; Ten Broek et al., 2010). O tecido muscular esquelético é composto por células musculares, também denominadas de fibras musculares, que são caracterizadas pelo formato poligonal e alongado. As fibras musculares são formadas através da fusão de mioblastos e devido a isso são multinucleadas, sendo que os seus núcleos estão localizados em sua periferia (Grefte et al., 2007; Junqueira, Carneiro, 2008).

Além das fibras musculares, o músculo esquelético também é constituído por tecido conjuntivo, tecido nervoso e vasos sanguíneos (Powers, Howley, 2005). O tecido conjuntivo tem a importante função de manter unidas as fibras musculares, permitindo que a contração gerada por cada fibra muscular ocorra de forma homogênea e seja transmitida para os tendões e ossos, além de dar suporte a uma extensa rede de capilares sanguíneos entre as fibras musculares e permitir a ligação de nervos às mesmas (Grefte et al., 2007; Jarvinen et al., 2005; Junqueira, Carneiro, 2008).

As fibras musculares exibem particularidades que conferem ao músculo esquelético algumas características exclusivas (Powers, Howley, 2005). A membrana da fibra muscular é designada sarcolema, e o citoplasma é denominado sarcoplasma, o qual contém proteínas celulares, organelas e miofibrilas (Howley, 2005; Powers e Howley, 2005). As miofibrilas são estruturas cilíndricas com cerca de 1 a 2 μm de diâmetro, que ficam paralelas ao eixo maior da fibra muscular (Junqueira, Carneiro, 2008). São as miofibrilas que garantem o padrão de estriamento devido à presença de bandas claras e escuras que se alternam por toda a sua extensão (Tajsharghi, 2008). As bandas claras são denominadas de bandas I, isotrópicas, enquanto as escuras denominam-se bandas A, anisotrópicas (Junqueira, Carneiro, 2008; Lieber, 2002; Macintosh et al., 2006). No centro de cada banda A, há uma banda H e no centro de cada banda I, existe uma linha transversal escura, chamada de linha Z (Junqueira, Carneiro, 2008; Lieber, 2002; Macintosh et al., 2006). A

região entre duas linhas Z é designada sarcômero, que é a unidade funcional contrátil do músculo esquelético (Lieber, 2002; Tajsharghi, 2008).

Os sarcômeros são constituídos por miofilamentos contráteis, cujos principais são: actina, miosina, troponina e tropomiosina, sendo que juntos os filamentos de actina e miosina representam 55% do total de proteínas do músculo esquelético (Junqueira, Carneiro, 2008; Macintosh et al., 2006).

Para que ocorra uma contração muscular, é necessário que impulsos nervosos sejam enviados por uma célula nervosa chamada de neurônio motor (Junqueira, Carneiro, 2008; Macintosh et al., 2006). O neurônio motor é formado por um corpo celular, também denominado soma, dendritos e um axônio. Sendo que, o corpo celular contém o núcleo da célula, os dendritos são responsáveis por receber sinais de outros neurônios, e o axônio tem a função de transmitir a mensagem enviada para as fibras musculares na forma de potencial de ação (Junqueira, Carneiro, 2008; Macintosh et al., 2006). A região onde ocorre a interação entre o axônio e a fibra muscular é chamada de junção neuromuscular. Um único neurônio motor tem a capacidade de inervar diversas fibras musculares, e o conjunto de um neurônio motor e as fibras musculares que este inerva é designado unidade motora (Junqueira, Carneiro, 2008; Macintosh et al., 2006).

Apesar de a contração muscular ser um processo altamente especializado, ela não ocorre de maneira homogênea em todos os músculos esqueléticos do corpo humano, variações na composição de proteínas levam a diferentes tipos de fibras musculares, e podem contribuir para propriedades contráteis distintas entre os músculos esqueléticos (Clark et al., 2002; Pette, Staron, 2000).

A molécula de miosina, como anteriormente discutido, é um importante componente no processo de contração (Pette, Staron, 2000). Essa molécula é composta de duas subunidades de miosina de cadeia pesada (*myosin heavy chain*–MHC) e duas subunidades de dois pares de miosina de cadeia leve (*myosin light chain* –MLC) (Tajsharghi, 2008).

A classificação do tipo de fibra no músculo esquelético se dá basicamente de acordo com a isoforma da MHC predominantemente expressa na fibra muscular (Bassel-Duby, Olson, 2006). As três isoformas predominantes no músculo adulto humano são: 1) MHC I, que é expressa em maior quantidade em fibras do tipo I, também denominadas fibras de contração lenta; 2) MHC IIx ou IIb, presente principalmente em fibras do tipo IIb ou fibras de contração rápida; e 3) MHC IIa, expressa em maior quantidade em fibras do tipo IIa, chamadas de fibras intermediárias, por possuírem características bioquímicas e

contráteis intermediárias às fibras de contração lenta e rápida (Powers, Howley, 2005; Tajsharghi, 2008).

As fibras musculares de contração lenta (tipo I), são ricas em mitocôndrias, possuem maior vascularização do que as fibras musculares de contração rápida, metabolismo predominantemente oxidativo e alta resistência à fadiga; entretanto, as fibras musculares de contração rápida (tipo II) possuem metabolismo predominantemente glicolítico e baixa resistência à fadiga. As fibras musculares do tipo I são abundantes em músculos posturais e que exercem tarefas de resistência, enquanto as fibras musculares do tipo II são recrutadas em músculos de movimentos rápidos e que exercem uma atividade de velocidade (Bassel-Duby, Olson, 2006). Além das diferenças discutidas, as fibras musculares do tipo I e do tipo II possuem variações na inervação, sendo que a fibra muscular do tipo I é inervada por neurônio motor de disparo tônico e a fibra muscular do tipo II por neurônio motor de disparo fásico (Bassel-Duby, Olson, 2006; Karagounis, Hawley, 2010; Pette, 2001). A porcentagem dos diferentes tipos de fibras musculares em um determinado músculo pode variar de acordo com a hereditariedade, os níveis hormonais, e o exercício físico (Powers, Howley, 2005).

A presença de diferentes tipos de fibras musculares e a possível conversão destas frente à diversas situações, garante uma notável plasticidade do tecido muscular. Além disso, o músculo também sofre outras adaptações dependendo da situação em que é submetido, como será descrito a seguir.

1.2 Plasticidade do músculo esquelético

Como previamente mencionado, o músculo esquelético pode sofrer uma conversão gradual dos tipos de fibras musculares desencadeada pela presença ou ausência de diversos estímulos. Na presença de estímulos como, por exemplo, o treinamento aeróbio as fibras musculares do tipo IIb podem sofrer conversão gradual em direção às fibras musculares do tipo I; na ausência de estímulos como, por exemplo, desuso do músculo esquelético, as fibras musculares do tipo I podem sofrer conversão gradual em direção às fibras musculares do tipo IIb, tornando-se menos resistentes à fadiga (Tiidus, 2008).

Através de estímulos que exigem uma maior demanda do músculo esquelético, como por exemplo, a sobrecarga mecânica induzida pelo treinamento de força (Matsakas, Patel, 2009; Schoenfeld, 2010) ou pela ablação de músculos sinergistas (Pehme et al., 2004), ocorre

hipertrofia muscular que é caracterizada pelo aumento da área de secção transversal das fibras musculares e, conseqüentemente da força muscular (Matsakas, Patel, 2009; Schoenfeld, 2010).

Na ausência ou redução da mobilidade muscular, como por exemplo, em situações de imobilização ou longos períodos de repouso, ocorre atrofia do músculo esquelético que é caracterizada pela redução da massa muscular indicada pela diminuição da área de secção transversal das fibras musculares e, conseqüente diminuição da força muscular (Cassano et al., 2009; Jackman, Kandarian, 2004; Lieber, 2002; Murphy et al., 2011).

Em situação de lesão, o músculo esquelético na tentativa de recuperar a sua estrutura e função danificadas também apresenta uma resposta adaptativa. Esse processo é denominado regeneração muscular e depende das células satélites, que serão abordadas no próximo item.

1.3 Células Satélites

A capacidade do músculo esquelético em se adaptar a diversos estímulos também é atribuída a uma população de células chamadas de células satélites (Hawke, Garry, 2001; Karagounis, Hawley, 2010). Quando o músculo sofre injúria ele é capaz de se regenerar por meio da ativação das células satélites, que em condições basais se localizam entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular em estado quiescente, entretanto, quando o músculo sofre um estímulo lesivo, essas células são ativadas por fatores liberados pelo músculo entre eles os *Insulin-like growth factors I e II* (IGF I e II), *Hepatocyte growth fator* (HGF), *Fibroblast growth fator* (FGF), *Transforming growth factors* (TGF- β), citocinas inflamatórias como *Interleukin-6* (IL-6), além de fatores liberados pelo neurônio motor e outros fatores de ativação (Harridge, 2007; Hawke, Garry, 2001). As células satélites ativadas passam a ser denominadas de células precursoras miogênicas ou mioblastos, as quais proliferam proporcionando o aumento do número de células miogênicas que posteriormente se diferenciam (Hawke, Garry, 2001; Wozniak et al., 2005). Este processo culmina na fusão destas células à fibra muscular acarretando na recomposição da estrutura da fibra muscular previamente lesada (Hawke, Garry, 2001; Wozniak et al., 2005), que passa a exibir núcleo centralizado, caracterizando uma fibra muscular regenerada (Salvini et al., 1999; Wernig, 1991).

Através da identificação de marcadores da célula satélite foi possível relatar a sua origem, ciclo celular e regulação molecular (Hawke, Garry, 2001). Fatores regulatórios

miogênicos, como por exemplo, *myogenic determination factor* (myoD), miogenina, *myogenic regulatory factor 4* (MRF4) e *myogenic factor 5* (myf5), foram identificados como grandes facilitadores e reguladores da resposta regenerativa muscular (Hawke, Garry, 2001). Devido ao aumento na expressão de diversos genes durante a ativação, proliferação e diferenciação de células satélites, como por exemplo, Myf5 e MyoD, ou a expressão de *neuronal cell adhesion molecule* (NCAM) que é detectável em estado quiescente e de proliferação, é possível identificar a expressão de células satélites em diferentes estágios (quiescência, proliferação, diferenciação) através desses marcadores específicos (Biressi, Rando, 2010; Cornelison, Wold, 1997; Covault, Sanes, 1986; Harridge, 2007; Hawke, Garry, 2001; Miller et al., 2000; Mitchell, Pavlath, 2004).

As células satélites são importantes facilitadoras da hipertrofia muscular, pois são responsáveis pela adição de novos núcleos para a fibra muscular promovendo a síntese de novas proteínas (Schoenfeld, 2010). Esses dados estão de acordo com a Teoria do domínio nuclear, a qual propõe que o núcleo da fibra muscular é responsável por regular a produção de mRNA por um finito volume citoplasmático, portanto, pode se dizer que cada região da célula é “administrada” por um núcleo que é cedido pela célula satélite de acordo com a necessidade. Dessa maneira, a relação entre núcleo e volume citoplasmático permanece constante (Schoenfeld, 2010; Van Der Meer et al., 2011). O número de células satélites também pode reduzir de acordo com o grau de atrofia muscular (Hikida et al., 1997), processo este que será abordado em maiores detalhes a seguir.

1.4 Atrofia do músculo esquelético

A atrofia muscular é uma adaptação do músculo esquelético que pode ser causada pelo desuso, como por exemplo, imobilização, desnervação ou exposição à microgravidade (Ferreira et al., 2008; Jackman, Kandarian, 2004; Kandarian, Jackman, 2006); além disso, pode ser ocasionada pelo avanço da idade ou por situação patológica, como por exemplo, câncer ou diabetes (Ferreira et al., 2008; Kandarian, Jackman, 2006; Sandri, 2008).

A atrofia do músculo esquelético é caracterizada principalmente pela diminuição da massa muscular evidenciada pela diminuição do diâmetro da fibra muscular, com consequente diminuição da produção de força, e da resistência à fadiga. Além disso, a

imobilização pode levar a uma conversão gradual da fibra muscular do tipo I em direção à fibra do tipo II (Ferreira et al., 2008; Foletta et al., 2011; Jackman, Kandarian, 2004).

Na atrofia muscular ocorre perda de organelas, de citoplasma e de proteínas da fibra muscular através de alterações em vias moleculares que levam à inibição do crescimento celular, isso acarreta na diminuição da massa muscular (Sandri, 2008). Além disso, estudos também têm demonstrado que em situação de atrofia muscular há diminuição do número de células satélites, o que pode comprometer a proliferação dessas células durante o processo de regeneração muscular e o controle da massa muscular (Hawke, Garry, 2001; Hikida et al., 1997; Jejurikar, Kuzon, 2003; Mitchell, Pavlath, 2004; Sandri, 2008).

A diminuição da massa muscular no processo de atrofia é resultante do desequilíbrio entre a síntese e a degradação proteica, o que tem estimulado a investigação de vias metabólicas envolvidas nestes processos (Bodine et al., 2001; Sandri, 2008).

Estudos têm demonstrado que em situação de atrofia muscular ocorre inibição de IGF-I que é o principal indutor da via de síntese proteica Akt/mTOR, e concomitantemente com a diminuição da síntese proteica há o aumento da degradação proteica (Jackman, Kandarian, 2004; Kandarian, Jackman, 2006). São conhecidas três vias de degradação proteica que podem ser ativadas durante o processo de atrofia causada por desuso da musculatura, são elas: a via das calpaínas, a via de sinalização lisossomal (via das catepsinas) e a via ubiquitina-proteassoma (Jackman, Kandarian, 2004).

A via das calpaínas é uma via cálcio dependente, portanto o aumento na concentração de cálcio intracelular leva a ativação desta via. As calpaínas são responsáveis pela clivagem de proteínas miofibrilares como as proteínas sarcoméricas titina e nebulina, responsáveis pela ancoragem do sarcômero, tornando estas disponíveis para posterior degradação pelo proteassoma (Powers et al., 2005).

A via das catepsinas é altamente ativada na atrofia causada por imobilização, pois em situação catabólica o fator de transcrição *forkhead box O 3* (FOXO3) é ativado e pode induzir a degradação proteica através da via de sinalização lisossomal (Zhao et al., 2008). As catepsinas não degradam proteínas citosólicas, como proteínas miofibrilares, porém, são responsáveis principalmente pela degradação de proteínas de membrana, como receptores, canais de íons e transportadores, além disso, podem degradar proteínas ubiquitinadas. Quando uma proteína é marcada para degradação por monoubiquitina ou diubiquitina é degradada pela via lisossomal, e quando a proteína é marcada por uma cadeia de poliubiquitinas essa proteína é degradada pela via ubiquitina-proteassoma (Jackman, Kandarian, 2004).

A via ubiquitina-proteassoma (Figura 1) está intimamente ligada à perda de massa muscular (Baptista et al., 2010; Bodine et al., 2001; Cai et al., 2004; Kandarian, Jackman, 2006; Moresi et al., 2010). No sistema ubiquitina-proteassoma é necessária a participação de três enzimas, E1 (enzima ativadora de ubiquitinas) que ativa a ubiquitina com gasto de ATP, E2 (enzima conjugadora de ubiquitinas) que forma um complexo poliubiquitina, e E3 (enzima ubiquitina-ligase) que faz com que a poliubiquitina se ligue ao substrato que deverá ser degradado pelo proteassoma (Figura 1) (Baptista et al., 2010; Lecker, 2003). As enzimas E3, como, por exemplo, atrogin-1 e MuRF1, são responsáveis por garantir a especificidade do sistema de degradação proteassomal, pois estas se ligam a sítios específicos das proteínas que serão degradadas, marcando-as para o reconhecimento e degradação pelo proteassoma 26S (Lecker, 2003).

Figura 1 - Via ubiquitina-proteassoma.

Nota: A E1 (enzima ativadora de ubiquitinas) ativa a ubiquitina com gasto de ATP, E2 (enzima conjugadora de ubiquitinas) forma um complexo poliubiquitina, e a E3 (enzima ubiquitina-ligase) liga o complexo de poliubiquitinas ao substrato que deverá ser degradado pelo proteassoma.

Fonte: Adaptado de Murton et al. (2008).

A elevação nos níveis de expressão do gene atrogin-1, também conhecido como *Muscle Atrophy F-box* (MAFbx), e do gene *Muscle Ring Finger1* (MuRF-1) em diversos modelos de atrofia muscular, demonstrou a importância desses genes como marcadores do

sistema ubiquitina-proteassoma (Bodine et al., 2001; Gomes et al., 2001; Latres et al., 2005). Bodine et al. (2001) mostraram que animais *knockout* para os genes atrogin-1 e MuRF-1 exibem fenótipo normal, porém, quando submetidos à atrofia muscular apresentam proteção contra a perda de massa muscular.

O aumento na expressão gênica de atrogin-1 e MuRF-1 é condicionado pela elevação dos níveis de fatores de transcrição, como *nuclear factor-kappaB* (NF- κ B) (Cai et al., 2004; Mitchell, Pavlath, 2004). O NF- κ B possui um importante papel como mediador da resposta inflamatória e imune. Em seu estado inativo, o NF- κ B se localiza no citoplasma acoplado à proteína inibitória I κ B. Em resposta a citocinas inflamatórias, em especial *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), o complexo I κ B Kinase (IKK) fosforila I κ B, fazendo com que o NF- κ B seja liberado e se transloque para o núcleo, induzindo a transcrição dos genes atrogin-1 e MuRF-1 (Figura 2) (Cai et al., 2004; Senf et al., 2008). Além de estimular a degradação proteica, um estudo recente *in vitro* tem apontado a possível participação do NF- κ B na inibição de MyoD através do tratamento com TNF- α , durante o desenvolvimento celular (Dahlman et al., 2010).

Figura 2 - Via do NF- κ B.

Nota: A partir do reconhecimento de citocinas inflamatórias, como por exemplo, o TNF- α , pelos receptores TNFr1 e TNFr2, o complexo IKK é ativado e fosforila I κ B, fazendo com que o NF- κ B seja liberado e se transloque para o núcleo, induzindo a transcrição dos genes atrogin-1 e MuRF-1.

Fonte: Adaptado de Bakkar e Guttridge (2010).

Considerando que a atrofia muscular possui um importante impacto em diversas situações clínicas, estudos têm se empenhado em investigar possíveis estratégias no intuito de minimizar e/ou prevenir a diminuição da massa muscular durante o processo de atrofia (Carmeli et al., 2009). Neste sentido, o aumento da expressão de HSPs, por elevação da temperatura corporal (Naito et al., 2000) ou por eletroporação de plasmídeos no tecido muscular (Senf et al., 2008, 2010), tem se mostrado eficiente na atenuação da atrofia muscular. As HSPs são proteínas que contribuem para a sobrevivência celular e o membro mais abundante e estudado dessa família é a HSP70 (Baba et al., 1998; Liu et al., 2006). Em resposta a situações de estresse a expressão de HSP70 é aumentada, o que consequentemente fornece proteção para a célula (Liu et al., 2006; Miyabara et al., 2006). As características gerais das HSPs e os mecanismos moleculares em que a HSP70 está envolvida no músculo esquelético serão abordados a seguir.

1.5 Características gerais das HSPs

Descritas pela primeira vez por Ritossa (Ritossa, 1962), as proteínas de choque térmico (HSPs), ou *proteínas de estresse*, foram primeiramente observadas em experimentos que indicavam o aumento do volume dos cromossomos de células de glândula salivar de *Drosófilas* quando expostas a elevadas temperaturas. Posteriormente, demonstrou-se que essa alteração de volume dos cromossomos se referia à indução transcricional de genes codificantes de HSPs (Lindquist, Craig, 1988; Parsell, Lindquist, 1993). Embora as HSPs tenham recebido essa denominação por serem sintetizadas em condições de elevadas temperaturas, são proteínas expressas em todas as células de eucariontes e procariontes em condições normais, e sua síntese é intensamente aumentada quando são expostas a vários estímulos nocivos (Baba et al., 1998), incluindo infecções (Collins, Hightower, 1982), arseneto de sódio (Li, 1983), hormônios esteroides (Norton, Latchman, 1989) tratamento com etanol (Plesset et al., 1982), metais pesados (Li, Laszlo, 1985) e aumento de temperatura (Touchberry et al., 2012).

As HSPs podem estar localizadas na mitocôndria, no citoplasma, na superfície celular ou soro, porém, são predominantemente proteínas intracelulares (Edelman et al., 2006). As HSPs são conhecidas como chaperonas por possuírem importante função em adaptação ao estresse e proteção celular, atuando principalmente na síntese e degradação proteica, além de regular processos celulares fundamentais, tais como formação, segregação, degradação e conformação de proteínas, e ressolubilização de agregados proteicos (Baba et al., 1998; Benjamin, Mcmillan, 1998; Clark et al., 2002; Edelman et al., 2006; Feldman, Frydman, 2000; Jensen, Johnson, 1999; Liu et al., 2006). As HSPs compreendem uma família caracterizada por grande homologia estrutural, evidenciada pela conservação da sequência de DNA e proteína ao longo da evolução (Lindquist, 1986).

A família das HSPs é dividida em subfamílias, classificadas de acordo com a massa molecular, dentre as quais se destacam as HSPs grandes (100 a 110 kDa), HSP90, HSP70, HSP60 e HSPs pequenas (8 a 27 kDa) (Lindquist, Craig, 1988).

As HSPs grandes, como por exemplo a de 110kDa, têm demonstrado importante função na proteção de ribossomos (Lindquist, Craig, 1988). A HSP90 possui papel fundamental como proteína reguladora da atividade dos receptores de hormônios esteróides, atuando como um componente do complexo associado ao receptor. A HSP60 é encontrada na mitocôndria, portanto é considerada HSP mitocondrial e é responsável por facilitar a conformação e montagem de proteínas, além de estabilizar proteínas em situação

de estresse. As pequenas HSPs têm um papel importante na marcação e remoção de proteínas desnaturadas, na contração muscular, na estabilização de microfilamentos, na sinalização de citocinas, no desenvolvimento muscular, além de facilitar a conformação de proteínas (Liu et al., 2006). Dentre as HSPs, a HSP70 é destacada por possuir funções essenciais, como uma importante chaperona atua em vias de degradação proteica, como a via ubiquitina-proteassoma, faz ligação de novas cadeias de aminoácidos nos ribossomos e mantém a correta translocação e conformação de proteínas precursoras do retículo endoplasmático e da mitocôndria no citosol (Pilon, Schekman, 1999).

1.6 HSP70 no músculo esquelético

A família da HSP70 é composta de quatro formas; a 72 kDa, a 73 kDa, a 75 kDa e a 78 kDa. As proteínas com maior peso molecular, 75 kDa e 78 kDa, são conhecidas como GRP75 e GRP78 e são induzidas por privação de glicose, influxo de cálcio ou agentes que interferem na glicólise, mas não por estresse térmico como as outras formas da mesma família. A HSP de 73 kDa é denominada como HSP70 constitutiva ou HSC70 (Kregel, 2002), pois é sintetizada no citoplasma em condições basais, sem estresse, porém, em situação de estresse migra para o núcleo (Liu et al., 2006). Esta proteína pode se ligar a pré-ribossomos desnaturados e facilitar sua reintegração. A proteína com o peso molecular de 72 kDa é também conhecida como HSP70 induzível (HSP70), pois sua síntese é estimulada pelo estresse celular, sendo assim, pode constituir mais de 20% do total de proteínas celulares em condições de estresse e lesão celular, dessa forma tal proteína também é considerada como um marcador de estresse (Baba et al., 1998; Liu, Steinacker, 2001; Liu et al., 2006)

A indução da HSP70 ocorre logo após um estímulo de estresse. O estresse celular leva à dissociação do *heat shock factor-1* (HSF-1) do complexo de chaperonas localizado no citoplasma, o qual permanece ligado a este complexo em situação basal reprimindo a ativação da HSP70 (Zou et al., 1998). Em sua forma livre no citoplasma o HSF-1 pode se vincular a outros HSFs-1 formando trímeros que se translocam para o núcleo (Wu, 1995) e se ligam à região promotora do gene HSP70, que é denominada *heat shock element* (HSE), induzindo a transcrição do gene HSP70 (Figura 3) (Morimoto et al., 1997). Consequentemente, os níveis de HSP70 (RNAm e proteína) aumentam nas células em estresse. Uma vez sintetizada a HSP70 se liga à proteína desnaturada na tentativa de

restaurar a sua estrutura terciária e atividade enzimática em um ciclo envolvendo a hidrólise de ATP (Gebauer et al., 1997).

A família das HSFs é dividida em quatro isoformas: HSF-1, 2, 3 e 4 (Liu et al., 2006; Santoro, 2000). O HSF-1, como já discutido, tem importante função na regulação da transcrição de HSPs e é induzido em resposta ao estresse celular. O HSF-2, diferente dos outros membros de sua família, participa do desenvolvimento ou diferenciação celular, o HSF-3 atua principalmente como co-regulador de HSF-1, e o HSF-4 tem se mostrado como regulador negativo da expressão dos genes de HSP (Santoro, 2000).

Figura 3 - Via de síntese da HSP70.

Nota: O estresse celular leva à dissociação do HSF-1 do complexo de chaperonas, o qual permanece ligado a este complexo em situação basal reprimindo a ativação da HSP70. Em sua forma livre no citoplasma o HSF-1 pode se vincular a outros HSFs-1 formando trimeros que se translocam para o núcleo e se ligam à região promotora do gene HSP70, que é denominada HSE, induzindo a transcrição do gene HSP70. A HSP70 livre no citoplasma exerce sua função de chaperona, agindo, por exemplo, contra desnaturalização de proteínas e na translocação e conformação correta de proteínas.

Fonte: Adaptado de Griffin et al., (2004) e Kregel et al., (2002)

A utilização de animais transgênicos hiperexpressantes de HSP70 induzível tem se mostrado um excelente modelo para evidenciar o importante papel dessa proteína na proteção de cardiomiócitos contra lesão induzida por isquemia-reperfusão (Marber et al., 1995), de músculos esqueléticos submetidos a lesões induzidas por contrações repetidas (Mcardle et al.,

2004) e criolesão (Miyabara et al., 2006). Além disso, o uso de drogas indutoras de síntese de HSPs tais como o radicicol, tem representado uma eficiente ferramenta para o estudo dos efeitos biológicos dessas proteínas. O radicicol é uma droga capaz de estimular a expressão de HSPs através da sua ligação à HSP90, a qual faz parte do complexo que regula o HSF-1 (Griffin et al., 2004). Tal ação do radicicol tem sido comprovada em aumentar a expressão de HSP90, HSP70 e HSP27 (Akimoto et al., 2004; Griffin et al., 2004) e foi capaz de promover proteção contra lesão em cardiomiócitos (Griffin et al., 2004) e no músculo esquelético (Miyabara et al., 2006).

Tem sido sugerido que a redução inicial da síntese proteica durante a imobilização muscular resulta de uma reduzida taxa de formação de cadeias polipeptídicas a nível ribossomal (Ku, Thomason, 1994). Considerando-se o fato da HSP70 exercer um papel importante como chaperona na formação de peptídeos durante a tradução, postulou-se que a redução dos níveis celulares de HSP70 em miócitos é um possível mecanismo para se explicar a baixa taxa de tradução durante situações de desuso da musculatura esquelética (Ku et al., 1995). De fato, Naito e colaboradores demonstraram que animais previamente expostos ao estresse em altas temperaturas apresentaram atenuação da atrofia muscular quando submetidos à imobilização, sugerindo que o aumento da expressão de HSP70 induzido por temperatura elevada foi capaz de proteger o músculo esquelético contra a perda de massa muscular.

Trabalhos mais recentes demonstraram que o aumento da expressão de HSPs em músculos esqueléticos induzida pela eletroporação de plasmídeos contendo HSP70 e HSP27 é capaz de minimizar a atrofia muscular (Dodd et al., 2009; Senf et al., 2008). No entanto, ainda restam muitas questões a serem investigadas com respeito aos efeitos das HSPs no músculo atrofiado como: a) as HSPs melhoram a recuperação de massa de músculos fenotipicamente distintos após a atrofia?; b) o efeito das HSPs em atenuar a atrofia muscular exerce influência sobre as células satélites?; d) as HSPs atuam sobre a prevenção da perda de força muscular induzida pela atrofia?; e) quais mecanismos intracelulares explicariam o envolvimento das HSPs na atenuação da atrofia muscular? No intuito de contribuir para o melhor entendimento deste assunto, este estudo se propõe a investigar o papel da HSP70 na atrofia muscular e subsequente recuperação após imobilização através da utilização de animais transgênicos hiperexpressantes de HSP70.

Considerando-se que 1) estratégias terapêuticas mais eficientes no intuito de prevenir os efeitos deletérios sobre o músculo esquelético ou melhorar a resposta muscular podem ser extremamente interessantes em situações de demanda reduzida (desuso da musculatura

esquelética) e de demanda aumentada (recuperação de massa muscular após períodos de imobilização) respectivamente; e 2) a indução de HSPs têm conferido a proteção e/ou melhor recuperação de diversos tipos celulares; este estudo tem como objetivo investigar aspectos histológicos, moleculares e funcionais do efeito da hiperexpressão de HSP70 (utilizando-se camundongos transgênicos hiperexpressantes de HSP70 induzível) na prevenção contra atrofia muscular e na subsequente recuperação do músculo esquelético após atrofia.

1.7 Justificativa e Relevância do estudo

Diante do importante papel das HSPs na proteção celular e regulação do trofismo muscular, o estudo do papel da HSP70 na atrofia muscular e subsequente recuperação contribuirá significativamente para o melhor entendimento da resposta biológica da célula muscular em situação de desuso do músculo esquelético.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem por objetivo contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na ação das HSPs em situação de desuso do músculo esquelético, através do estudo do papel da HSP70 na atrofia muscular e subsequente recuperação da massa muscular após imobilização utilizando-se camundongos transgênicos hipexpressantes de HSP70.

2.2 Objetivos específicos

- a) Estudar o papel da HSP70 em aspectos macroscópicos (massa muscular) e histológicos (morfologia geral e número de células satélites) da atrofia muscular e subsequente recuperação;
- b) estudar o papel da HSP70 na regulação de elementos da via proteolítica ubiquitina-proteassoma durante os processos de atrofia e subsequente recuperação do músculo esquelético;
- c) estudar o papel da HSP70 na função contrátil em músculos atrofiados e em recuperação após imobilização.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB) de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal seguidos pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA. 048/10). Nosso laboratório e nossa Instituição possuem Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB. 0046/98) que permite a utilização de animais geneticamente modificados. Os camundongos transgênicos para HSP70 foram doados pelo Prof. Dr. Ruben Mestril da Loyola University of Chicago, com quem colaboramos. Iniciamos o estabelecimento de uma colônia desses animais no Biotério de nossa Instituição para atender à demanda dos nossos experimentos.

3.1 Animais

Foram utilizados aproximadamente 60 camundongos machos selvagens (CB6F1) e 60 camundongos transgênicos hiperexpressantes de HSP70 (2 meses de idade ambos) que foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas contendo maravalha, água e ração ad libitum, com regime claro/escuro de 12h/12h.

3.2 Grupos experimentais

Os camundongos selvagens e transgênicos foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (n=5 cada), sendo 3 grupos de camundongos selvagens (WT) e 3 de camundongos transgênicos (HSP70) para análise morfológica, funcional e de expressão gênica. Para a análise da expressão gênica foram gerados 5 grupos de animais WT e 5 grupos de animais HSP70 em diferentes períodos de imobilização, como segue:

3.2.1 Grupos experimentais para análise morfológica, funcional e expressão proteica:

- a) Grupo controle WT intacto: O músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda dos camundongos selvagens não sofreram nenhum procedimento experimental e serviram de controle;

- b) Grupo WT imobilizado por 7 dias: Os camundongos selvagens tiveram o músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda imobilizados durante 7 dias e posteriormente analisados;
- c) Grupo WT imobilizado por 7 dias e recuperado por 7 dias: Os camundongos selvagens tiveram o músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda imobilizados durante 7 dias, foram liberados da imobilização e após 7 dias foram sacrificados para posterior análise;
- d) Grupo controle HSP70 intacto: O músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda dos camundongos HSP70 não sofreram nenhum procedimento experimental e serviram de controle;
- e) Grupo HSP70 imobilizado por 7 dias: Os camundongos HSP70 tiveram o músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda imobilizados durante 7 dias e posteriormente analisados;
- f) Grupo HSP70 imobilizado por 7 dias e recuperado por 7 dias: Os camundongos HSP70 tiveram os músculos EDL e o músculo SOL da pata esquerda imobilizados durante 7 dias, foram liberados da imobilização e após 7 dias foram sacrificados para posterior análise.

3.2.2 Grupos experimentais para análise de expressão gênica:

- a) Grupo controle WT intacto: O músculo extensor longo dos dedos (EDL) e o músculo Sóleo (SOL) da pata esquerda dos camundongos selvagens não sofreram nenhum procedimento experimental e serviram de controle;
- b) Grupo WT imobilizado por 24 horas: Os camundongos selvagens tiveram o músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda imobilizados durante 24 horas e posteriormente analisados;

- c) Grupo WT imobilizado por 48 horas: Os camundongos selvagens tiveram o músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda imobilizados durante 48 horas e posteriormente analisados;
- d) Grupo WT imobilizado por 3 dias: Os camundongos selvagens tiveram o músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda imobilizados durante 3 dias e posteriormente analisados;
- e) Grupo WT imobilizado por 7 dias: Os camundongos selvagens tiveram o músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda imobilizados durante 7 dias e posteriormente analisados;
- f) Grupo controle HSP70 intacto: O músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda dos camundongos selvagens não sofreram nenhum procedimento experimental e serviram de controle;
- g) Grupo HSP70 imobilizado por 24 horas: Os camundongos selvagens tiveram o músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda imobilizados durante 24 horas e posteriormente analisados;
- h) Grupo HSP70 imobilizado por 48 horas: Os camundongos selvagens tiveram o músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda imobilizados durante 48 horas e posteriormente analisados;
- i) Grupo HSP70 imobilizado por 3 dias: Os camundongos selvagens tiveram o músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda imobilizados durante 3 dias e posteriormente analisados;
- j) Grupo HSP70 imobilizado por 7 dias: Os camundongos selvagens tiveram o músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda imobilizado durante 7 dias e posteriormente analisado.

3.3 Protocolo de imobilização

Camundongos selvagens e transgênicos hiperexpressantes de HSP70 foram anestesiados com ketamina e xilazina (30 e 10 mg/kg, respectivamente) e o músculo EDL e o músculo SOL da pata esquerda dos animais foram imobilizados na posição neutra da articulação do tornozelo utilizando-se gesso. Em todos os períodos avaliados houve músculos de camundongos transgênicos e de camundongos selvagens e seus respectivos controles.

3.4 Western blot

Para a detecção da expressão da proteína HSP70 as amostras musculares foram homogeneizadas em tampão de extração contendo KCl 3 M (Cloreto de Potássio, Amresco, Ohio, EUA), HEPES 1M (Amresco, Ohio, EUA), MgCl₂ 1 M (Cloreto de Magnésio, Amresco, Ohio, EUA), EDTA 0,5 M (Amresco, Ohio, EUA), glicerol 10% (Amresco, Ohio, EUA), DTT 1M (Dithiothreitol; Invitrogen, EUA) SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA), inibidor de protease (Sigma-Aldrich, Alemanha), ortovanadato (Sigma-Aldrich, Alemanha) e PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma-Aldrich, Alemanha). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi obtido e a concentração de proteínas foi determinada pela análise de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) tendo como referência a albumina do soro bovino (Sigma-Aldrich, Alemanha). Quantidades iguais de proteínas (50 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e foram transferidas a uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA). As membranas foram coradas com Ponceau S para confirmar a transferência de quantidades iguais de proteínas para a membrana de nitrocelulose e depois foram lavadas com o tampão salina Tween Tris (0,5 M NaCl; 50 mM Tris-HCl em pH 7.4 e 0,1% de Tween 20). As membranas foram incubadas por toda a noite com anticorpo primário (Assay designs, *rabbit polyclonal anti-HSP72*; número de catálogo SPA-812; Stressgen, Canadá) a 4 °C. O anticorpo foi diluído (diluição 1:2000) em tampão salina Tween Tris (TBST). Depois de uma lavagem de 30 minutos em TBST, membranas foram incubadas durante 1 hora em temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado a *horseradish* peroxidase (diluído em tampão salina Tween Tris; *goat anti-rabbit*; Peroxidase-conjugated; diluição 1:5000; número de catálogo 111-035-003; Jackson, West Grove, PA, EUA) capaz de produzir uma reação de quimiluminescência (ECL;

Amersham, UK), que foi capturada em filme fotográfico. Os sinais nos filmes foram digitalizados por scanner.

3.5 Imunohistoquímica

Os fragmentos dos músculos destinados à imunohistoquímica foram pré-congelados em isopentano (Synth) por 10 segundos e rapidamente imersos em nitrogênio líquido. Os músculos foram seccionados transversalmente em criostato (IEC Minotome) (10 µm de espessura).

Secções dos músculos fixadas foram submetidas à reação imunohistoquímica para MHCI e MHCII para analisar a morfologia geral dos diferentes tipos de fibras musculares e determinar a área de secção transversal das mesmas.

As secções dos músculos foram fixadas com paraformaldeído (PFA; Alfa Aesar, Massachusetts, EUA) 4% em 0,2 M de PB (*Phosphate Buffer*; Tampão Fosfato; Amresco, Ohio, EUA) por 10 minutos em temperatura ambiente, bloqueadas com 0,1 M de glicina (Amresco Ohio, EUA) em PBS (*Phosphate Buffer Saline*; Tampão Fosfato Salino; Sigma-Aldrich, Alemanha) por 5 minutos e permeabilizadas em 0,2% de triton em X-100 (Amresco, Ohio, EUA)/PBS por 10 minutos. As lâminas foram incubadas com solução contendo o anticorpo primário 1) contra NCAM (*rabbit anti-NCAM*; diluição 1:500; número de catálogo AB5032; Millipore, Billerica, MA, USA,), para a análise das células satélites; 2) contra MHCI (*mouse to slow Skeletal Myosin Heavy Chain*; diluição 1:6000; número de catálogo 11083; Abcam, Cambridge, MA, EUA) para a análise da fibra muscular do tipo I; ou 3) contra MHCII (*mouse to fast Skeletal Myosin Heavy Chain II*; diluição 1:150; número de catálogo 7784; Abcam, Cambridge, MA, EUA) para análise da fibra muscular do tipo II; com 3% de *normal goat serum* e 0,3% de triton X-100/0,1 M PB por toda a noite em recipiente úmido (4 °C). Após a lavagem com 0,1 M PB (3 vezes de 10 minutos cada), a solução contendo o respectivo anticorpo secundário, para NCAM Rodamina (*goat polyclonal anti-rabbit*; diluição 1:100; número de catálogo 6718; Abcam, Cambridge, MA, EUA), para MHCI e MHC II FITC conjugated (*goat anti-mouse*; diluição 1:50; número de catálogo 115-095-166; Jackson IR), e 0,3% de triton X-100/0,1 PB foi adicionada por 2 horas em sala escura. Após 15 minutos de lavagem em PBS as lâminas foram cobertas com as lamínulas utilizando-se a resina Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI (H-1200, Vector Labs, Southfield, MI, EUA)

3.6 Análise quantitativa e morfométrica

As análises quantitativas e morfométricas foram realizadas com base em Dedkov et al. (2003) e Miyabara et al. (2006), utilizando-se o criostato (Leica, Nussloch, Alemanha) em -25 °C para cortar o músculo transversalmente, posteriormente os cortes foram corados utilizando os métodos descritos em Imunohistoquímica (seção 5.4). As imagens obtidas utilizando o microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E1000, ACT-1 versão 2.20), a análise de área de secção transversal e a contagem de células satélites foram realizadas utilizando-se o programa Image Pro-plus, Media Cybernetic (Versão 3.0.01.00).

3.7 Contração muscular *in vitro*

Na realização dos experimentos de contração muscular *in vitro* foram utilizados camundongos exclusivamente para este fim. Imediatamente após o sacrifício por decapitação, o músculos EDL e músculo SOL foram removidos. Os músculos foram montados em comprimento constante em um banho de tecido contendo solução Krebs Ringer Bicarbonato oxigenada (1,19 M NaCl, 94 mM KCl, 50 mM CaCl₂. 2H₂O; 24 mM MgCl₂. 7H₂O, 24 mM KH₂PO₄, 250 mM NaHCO₃, e 1M D-glicose). A solução foi gaseificada constantemente com 95% O₂-5% CO₂ e a temperatura mantida em 37 °C.

A preparação e as condições experimentais usadas no estudo *in vitro* do músculo EDL e do músculo SOL foram descritas previamente por Segal e Faulkner (Segal, Faulkner, 1985). Um dos tendões do músculo avaliado foi amarrado com uma linha (4-0) a um braço de suporte e o outro tendão foi amarrado ao braço de alavanca de um servomotor que controla o comprimento muscular e mede a força desenvolvida pelo músculo.

O servomotor é controlado por um computador para mover o braço de alavanca através de uma dada distância a uma velocidade constante. O computador também foi usado para coletar e analisar os dados de força.

Inicialmente foi estabelecido o comprimento inicial de tensão máxima para os músculos isolados. Todas as medidas subsequentes foram realizadas em tensão máxima. Os músculos foram eletricamente estimulados entre dois eletrodos de platina. Para a contração tetânica máxima utilizou-se uma duração de trem de pulso de 0,8 segundos e a estimulação da frequência foi fixada a 100 Hz e então ajustada em incrementos de 50 Hz até se obter a força isométrica máxima. As contrações foram obtidas em gramas e convertidas a miliNewton (mN).

3.8 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR em tempo real

No intuito de detectar a expressão gênica de MuRF-1 e Atrogin-1 foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando-se como normalizador o fator de transcrição IID (TFIID). A sequência dos primers utilizados (Quadro 1) foram obtidas de Sacheck et al., 2002 (MuRF-1), banco de dados do BLAST (atrogin-1; GI-158517905) e Silva et al, 2011 (TFIID) respectivamente (Sacheck et al., 2004; Silva et al., 2011) e todos os primers foram sintetizados pela Invitrogen.

Quadro 1 - Sequência de primers utilizados

Primers	Forward	Reverse
Murf-1	AGGACAACCTCGTGCCTACAAG	ACAACCTGTGCCGCAAGTG
Atrogin1	AGTCGGCAAGTCTGTGCTGGT	AAGCACACAGGCAGGTCGGT
TFIID	TTAGGCCTGGAAAGGTGTTACG	CCTCCAAACAGATGGAACATTCT

Para o isolamento do RNA total (ácido ribonucleico), o músculo previamente isolado foi colocado em 500 µl de trizol (Invitrogen, EUA), de acordo com recomendações do manual, e homogeneizado. Logo após, foi adicionado 200 µl de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e agitado vigorosamente com as mãos por 20 segundos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. A primeira fase sobrenadante formada no tubo (ácidos nucleicos) foi retirada e colocada em um novo tubo, onde foi acrescentado 250 µl de isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e agitado vigorosamente com as mãos por 20 segundos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e descartado. Foi adicionado 500 µl de etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e agitado até o pellet se soltar. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7500g por 5 minutos a 4 °C. O etanol foi descartado e foi adicionado 10 µl de TE (Tris-EDTA pH7.4; Amresco Ohio, EUA). Tubos do tipo eppendorf foram colocados no termomixer a 55 °C por 15 minutos. Logo após, as amostras foram homogeneizadas e quantificadas em Nano-drop (Thermo Scientific). Quantidades iguais de RNA (2 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose denaturante no intuito de verificar a integridade da amostra.

Em seguida, foi realizada a transcriptase reversa, para tanto 2 µg das amostras de RNA total juntamente com 1ul de oligo dT (500 µg/ml; Sigma) e completadas com água

dietilpirocarbonato (DEPC, Amresco, Ohio, EUA) para um volume total de 12,5 µl, as amostras foram colocadas no termociclador por 10 minutos a 72 °C. Logo após, foi adicionado a cada amostra um Mix contendo 4 µl de 5X Buffer (Invitrogen, EUA), 2 µl de DTT (0,1 M), 1 µl de dNTP mix (0,5 mM) e 0,5 µl da enzima transcriptase reversa (200 U/µl; Invitrogen, EUA), e em seguida incubada a 42 °C por 60 minutos, e posteriormente a 95 °C por 10 minutos tendo como resultado a dupla fita de DNA complementar (cDNA). As amostras de cDNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% não denaturante no intuito de verificar a integridade do cDNA.

As amostras de cDNA obtidas foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para cada gene, o PCR foi conduzido em duplicata com volume final da reação de 10 µl. Para tanto, foi adicionado a cada amostra um mix contendo o primer Forward e Reverse do gene de interesse (400nM cada), Syber Green (Platinum SYBR QPCR 100 (11 µl; Invitrogen, EUA) água ultra pura (8,06 µl; Amresco, Ohio, EUA) e a amostra de cDNA (20 ng). Cada amostra foi submetida a 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 59 °C por 60 segundos. A fluorescência foi quantificada e a amplificação foi analisada com o Rotor-Gene 6000 real-time sistema detector de sequencia (Cobertt Research). Os resultados foram expressados usando método comparativo do limiar do ciclo (*Cycle threshold*; – Ct) como descrito em *Applied Biosystems User Bulletin*. Para cada amostra os valores de delta Cycle threshold (ΔCt) foram calculados usando a seguinte fórmula: Ct do gene de interesse menos o Ct do gene repórter usando o TFIID como gene controle. As mudanças dos níveis de expressão de um gene específico nos grupos tratados (delta delta Cycle threshold; $\Delta\Delta Ct$) foram calculados através da seguinte equação: $\Delta Ct_{\text{grupo tratado}} - \Delta Ct_{\text{grupo controle}}$. Os valores foram determinados como segue: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que o valor arbitrário 1 foi atribuído ao grupo controle.

3.9 Análise estatística

O teste “t-student” foi utilizado para a comparação entre dois grupos e a análise de variância (ANOVA) seguida do teste Tukey foi realizada para a comparação múltipla entre mais e dois grupos. Para todas as comparações foi considerado como valor significativo um $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão da proteína HSP70

Através da análise da expressão da proteína HSP70 foi possível confirmar a hiperexpressão dessa proteína estudada nos animais transgênicos no grupo controle de ambos os músculos quando comparados ao grupo WT (Figura 4). Após 7 dias de imobilização, houve aumento da expressão da proteína HSP70 nos músculos EDL e SOL de ambos os grupos WT e HSP70, porém quando estes foram submetidos à recuperação por 7 dias, o nível de expressão da proteína foi reduzido (Figura 4).

Figura 4 - Expressão da HSP70 do músculo extensor longo dos dedos (EDL) e soleo (SOL) de animais selvagens (WT) e transgênicos (HSP70).

Expressão de HSP70 em músculos controle intacto (C), imobilizado por 7 dias (I), e imobilizado por 7 dias e recuperado por 7 dias (I+R), dos animais WT e HSP70 (n=3) dos animais WT e HSP70. A técnica de Western blot foi realizada utilizando-se anticorpo contra proteína HSP70 e subsequentemente contra a proteína GAPDH.

4.2 Peso Corporal e Muscular

Os animais HSP70 apresentaram menor peso corporal quando comparado aos animais WT ($17,37\text{g} \pm 1,6$ vs $24,48\text{g} \pm 2,9$, respectivamente, $p < 0,05$; Figura 4). O peso do músculo EDL em ambos os grupos, WT e HSP70, não apresentou alteração significativa com a imobilização (Tabela 1). Entretanto, o peso do músculo SOL foi reduzido após a imobilização nos animais WT e animais HSP70 quando comparado aos seus respectivos controles (dados normalizados: 25% e 35%, respectivamente, $p < 0,05$; dados não-normalizados: 25% e 40% respectivamente, $p < 0,05$ Tabela 1). Os animais WT que foram em seguida submetidos à recuperação de 7 dias após a liberação da imobilização permaneceram com o peso muscular reduzido, porém os animais HSP70 recuperaram a massa muscular quando comparados aos

seus respectivos controles (dados normalizados: 28% e 10%, respectivamente, $p < 0,05$; dados não-normalizados: 21% e 12%, respectivamente, $p < 0,05$; Tabela 1).

Figura 5 – Peso corporal (PC; g) dos animais selvagens (WT) e transgênicos hiperexpressantes de HSP70 (HSP70).

Peso corporal (g) dos animais Selvagens (barra preta; WT) e transgênicos hiperexpressantes de HSP70 (barra branca; HSP70). O teste “t-student” foi utilizado para a comparação entre os dois grupos. * $p < 0,05$ vs respectivo grupo C.

Tabela 1 - Peso muscular não normalizado (PM; mg), peso muscular normalizado (PM/PC; mg/g) e Peso Seco (PS; mg) do músculo Extensor longo dos dedos (EDL) e Sóleo (SOL) dos grupos WT e HSP70.

Grupos	EDL			SOL		
	C	I	I+R	C	I	I+R
WT PM	8,8±1,1	8,0±1,2	8,7±1,2	7,4±1,4	5,5±1,1*	5,8±1,0*
HSP70 PM	5,7±1,0 ^a	6,0±2,0 ^a	5,7±0,8 ^a	5,0±1,1 ^a	3,0±0,5* ^a	4,4±1,0 ^{#a}
WT PM/PC	0,39±0,05	0,35±0,03	0,35±0,05	0,32±0,04	0,24±0,03*	0,23±0,04*
HSP70 PM/PC	0,33±0,05	0,33±0,11	0,32±0,05	0,28±0,06	0,18±0,03* ^a	0,25±0,05 [#]
WT PS	2,8±0,4	2,5±0,2	3,0±0,2	2,5±0,5	1,1±0,1*	1,8±0,1*
HSP70 PS	2,2±0,4	2,5±0,2	2,2±0,3 ^a	1,8±0,1 ^a	1,2±0,1	1,3±0,4

Valores expressos em média ± desvio padrão. n= 5-6. Teste ANOVA seguido por teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos foram aplicados para verificar diferenças entre os grupos: C (controle), I (Imobilizado por 7 dias) e I+R (imobilizado e recuperado por 7 dias) dos animais selvagens (WT) e transgênicos hiperexpressantes de HSP70 (HSP70), respectivamente. *p<0,05 vs respectivo grupo C; [#]p<0,05 vs respectivo grupo I; ^a p<0,05 vs respectivo grupo dos animais WT.

O peso seco do músculo EDL, assim como o peso úmido, não apresentou alteração significativa quando submetido à imobilização por 7 dias em ambos os grupos de animais, WT e hiperexpressantes de HSP70 (Tabela 1). O músculo SOL dos animais WT imobilizados reduziu 56% do peso seco quando comparado ao seu controle, e o grupo submetido à recuperação permaneceu com 28% da massa muscular reduzida quando comparado ao grupo controle (p<0,05; Tabela 1). Entretanto, os animais HSP70 não apresentaram alteração estatisticamente significativa da massa muscular (p<0,05; Tabela 1). Considerando que a medida do peso muscular é pouco refinada, também realizamos a detecção da AST das fibras musculares do tipo I e II no intuito de avaliar melhor as alterações de massa muscular nos grupos imobilizados e recuperados (Figura 6).

4.3 Área de secção transversal

As fibras do tipo I do músculo EDL não apresentaram alteração significativa na área de secção transversal (AST) dos grupos imobilizados nos animais WT e HSP70 (Figura 6 A1). Resultados semelhantes foram observados quando os valores foram normalizados pelo

peso corporal (Figura 6 B1). As fibras musculares do tipo II do EDL apresentaram significativa diminuição da AST no grupo imobilizado dos animais WT, porém, não houve alteração significativa nos animais HSP70 quando comparados aos respectivos controles nos dados não normalizados (50% e 16%, respectivamente, $p < 0,05$, Figura 6 A2) e normalizados pelo peso corporal (AST/PC) (57% e 9%, respectivamente, $p < 0,05$, Figura 6 B2). Após 7 dias de recuperação, a AST das fibras musculares do tipo II no EDL, ainda apresentou-se reduzida nos animais WT (54% e 60% vs grupo controle, nos dados não normalizados e normalizados respectivamente; $p < 0,05$, Figura 6 A2 e 6 B2), porém, retornou aos valores do grupo controle nos camundongos HSP70 (Figura 6 A2 e 6 B2).

As fibras do tipo I do músculo SOL tiveram a área de secção transversal reduzida nos animais WT e HSP70 quando submetidos à imobilização por 7 dias (26% e 17%, respectivamente, $p < 0,05$; Figura 6 A3), entretanto quando os dados de AST foram normalizados pelo PC observamos uma tendência de redução nos grupos imobilizados dos animais WT e HSP70, porém esta não foi significativa (19% e 20%, respectivamente, $p < 0,05$; Figura 6 B3). Após 7 dias de recuperação, a AST das fibras musculares do tipo I, ainda apresentou-se reduzida nos animais WT nos dados não normalizados e normalizados (12% e 18% vs grupo controle, respectivamente; $p < 0,05$, Figura 6 A3 e 6 B3), porém, retornou aos valores do grupo controle nos camundongos HSP70 (Figura 6 A3 e 6 B3). As fibras do tipo II no músculo SOL também apresentaram redução significativa da AST nos animais WT no grupo imobilizado e os animais HSP70 apresentaram tendência de queda, mas esta não foi significativa (35% e 22%, respectivamente, $p < 0,05$; Figura 6 A4; 23% e 20% respectivamente, $p < 0,05$; Figura 6 B4). Após a recuperação por 7 dias, os animais WT ainda permaneceram com AST e AST/PC das fibras musculares do tipo II reduzidas (30% e 18% vs grupo controle, respectivamente $p < 0,05$, Figura 6 A4 e 6 B4), entretanto, os animais HSP70 apresentaram a AST similar ao controle.

Figura 6 - Área de secção transversal não normalizada (AST; μm^2) e normalizada pelo peso corporal (AST/PC; $\mu\text{m}^2/\text{g}$) das fibras musculares do tipo I (MHC I) e II (MHCII) do músculo extensor longo dos dedos (EDL) e Sóleo (SOL) de animais Selvagens (WT) e transgênicos hiperexpressantes de HSP70 (HSP70).

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. n= 5-6. Teste ANOVA seguido por teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos foram aplicados para verificar diferenças entre os grupos: C (controle), I (Imobilizado por 7 dias) e I+R (imobilizado e recuperado por 7 dias) dos animais selvagens (WT) e transgênicos hiperexpressantes de HSP70 (HSP70), respectivamente. *p<0,05 vs respectivo grupo C; #p<0,05 vs respectivo grupo I; ^ap<0,05 vs respectivo grupo dos animais WT.

4.4 Células satélites

Nos animais WT a porcentagem de células satélites positivas para NCAM foi significativamente diminuída nos músculos EDL e SOL imobilizados (56% e 35% respectivamente, $p < 0,05$, Tabela 2, Figura 7). Após 7 dias de recuperação, os animais WT continuaram com o número reduzido de células satélites positivas para NCAM no músculo EDL e SOL (68% e 57% respectivamente, $p < 0,05$, Tabela 2). Entretanto, os animais HSP70 não apresentaram alteração no número de células satélites positivas para NCAM em ambos os músculos estudados (Tabela 2).

Tabela 2 - Porcentagem de células satélites positivas para Neuronal Cell Adhesion Molecule (NCAM;%) do músculo Extensor longo dos dedos (EDL) e Sóleo (SOL) dos grupos WT e HSP70.

	EDL			SOL		
Grupos	C	I	I+R	C	I	I+R
WT NCAM (%)	1,6±0,5	0,7±0,03*	0,5±0,3*	1,4±0,2	0,9±0,3*	0,6±0,1*
HSP70 NCAM (%)	1,7±0,7	1,7±0,3	1,5±0,6	1,4±0,6	1,1±0,4	1,9±0,3

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. n= 5-6. Teste ANOVA seguido por teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos foram aplicados para verificar diferenças entre os grupos: C (controle), I (Imobilizado por 7 dias) e I+R (imobilizado e recuperado por 7 dias) dos animais selvagens (WT) e transgênicos hiperexpressantes de HSP70 (HSP70), respectivamente. * $p < 0,05$ vs respectivo grupo C; # $p < 0,05$ vs respectivo grupo I; ^a $p < 0,05$ vs respectivo grupo dos animais WT.

Figura 7 - Imunomarcacão representativa de células satélites com anticorpo contra NCAM em secções transversais de músculos EDL dos grupos WT e HSP70.

Os seguintes grupos foram avaliados: (C) Grupo controle dos animais WT e HSP70; (I) grupo Imobilizado por 7 dias dos animais grupo WT e HSP70; (IR) grupo Imobilizado por 7 dias e recuperado por 7 dias dos animais WT e HSP70. Objetiva de 40x.

4.5 Contração tetânica máxima

Na avaliação da contração tetânica máxima, os músculos EDL apresentaram tendência de queda em sua força nos animais WT e HSP70, porém esta não foi significativa (Tabela 3). Os grupos recuperados apresentaram valores semelhantes aos dos seus respectivos grupos controle (Tabela 3). Entretanto, o músculo SOL apresentou queda de força no grupo WT imobilizado e não houve recuperação da força quando submetido a 7 dias de recuperação (54%; Tabela 3). Os animais HSP70 não apresentaram redução da força muscular após a imobilização (Tabela 3).

Tabela 3 - Contração Tetânica Máxima (CTM; mN) do músculo Extensor longo dos dedos (EDL) e do músculo sóleo (SOL) dos grupos WT e HSP70.

	EDL			SOL		
Grupos	C	I	I+R	C	I	I+R
WT CTM	44,2±7,6	44,4±7,6	48,0±7,0	56,9±10,5	25,8±16,2*	30,1±13,0*
HSP70 CTM	50,1±6,7	41,1±8,4	54,4±7,1	32,4±8,9 ^a	30,5±6,5	32,0±9,3

Valores expressos em média ± desvio padrão. n= 4-5. Teste ANOVA seguido por teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos foram aplicados para verificar diferenças entre os grupos: C (controle), I (Imobilizado por 7 dias) e I+R (imobilizado e recuperado por 7 dias) dos animais selvagens (WT) e transgênicos hiperexpressantes de HSP70 (HSP70), respectivamente. *p<0,05 vs respectivo grupo C; #p<0,05 vs respectivo grupo I; ^a p<0,05 vs respectivo grupo dos animais WT.

4.6 Expressão dos genes Atrogin-1 e MuRF-1

Considerando-se que o SOL foi o músculo mais afetado após a imobilização, decidimos realizar as análises moleculares apenas no músculo SOL. Realizamos uma curva de diferentes períodos de imobilização (24 horas, 48 horas, 3 dias e 7 dias) e detectamos a expressão do gene Atrogin-1 (figura 8) em que foi possível verificar que a maior expressão desse gene ocorre na fase aguda, ou seja, em 24 e 48 horas após imobilização nos animais WT (333% e 327%, respectivamente, p<0,05, figura 8). Os animais hiperexpressantes de HSP70 não apresentaram alteração na expressão do Atrogin-1 durante os períodos de imobilização analisados.

Figura 8 - Expressão gênica de Atrogin-1 no músculo sóleo (SOL) de animais selvagens (WT) e transgênicos (HSP70).

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão, $n=4$. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimento para múltiplas comparações foram aplicadas para verificar diferença entre os grupos: C (controle), I (Imobilizado por 7 dias e I+R (imobilizado e recuperado por 7 dias) dos animais WT e HSP70, respectivamente; *^a $p<0,05$ vs respectivo grupo dos animais WT.

Semelhante ao resultado observado na curva de expressão do gene Atrogin-1 (figura 8) a maior expressão do gene MuRF-1 (figura 9) ocorreu na fase aguda, com 48 horas após imobilização, ocorrendo alteração significativa da expressão gênica somente nos animais WT, pois os animais hiperexpressantes de HSP70 não apresentaram alteração na expressão do MuRF-1 durante os períodos de imobilização observados.

Figura 9 - Expressão gênica de MuRF-1 no músculo sóleo (SOL) de animais selvagens (WT) e transgênicos (HSP70).

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão, $n=4$. Teste ANOVA seguido por Tukey, procedimento para múltiplas comparações foram aplicadas para verificar diferença entre os grupos: C (controle), I (Imobilizado por 7 dias e I+R (imobilizado e recuperado por 7 dias) dos animais WT e HSP70, respectivamente; *^a $p<0,05$ vs respectivo grupo dos animais WT.

5 DISCUSSÃO

A perda de massa muscular é uma importante manifestação clínica que pode ser ocasionada por desuso, imobilização/redução de atividade, deficiência na alimentação, uso de medicamentos específicos, glicocorticóides, envelhecimento e por patologias como câncer ou diabetes (Bodine et al., 2001; Carmeli et al., 2009; Cassano et al., 2009; Jackman, Kandarian, 2004). Essas situações levam à atrofia muscular por reduzir a síntese proteica e/ou aumentar a degradação proteica (Cao et al., 2005; Senf et al., 2008). Além disso, a atrofia muscular está associada à diminuição da capacidade funcional do músculo esquelético e aumento do risco de morbidade e/ou mortalidade (Cassano et al., 2009; Gomes et al., 2001).

Considerando que trabalhos anteriores demonstraram proteção contra atrofia muscular utilizando a hiperexpressão da proteína HSP70 através da hipertermia (Selsby, Dodd, 2005; Senf et al., 2010) ou da eletroporação de plasmídeo (Senf et al., 2008, 2010), o presente estudo também demonstra uma possível proteção contra a perda de massa muscular utilizando camundongos transgênicos hiperexpressantes de HSP70, sendo este um modelo mais fisiológico. A HSP70 é a proteína citoprotetora mais abundante da família das HSPs (Liu, Steinacker, 2001), além de ser altamente conservada, a HSP70 apresenta duas características importantes, isto é, chaperona molecular e sensível ao estresse celular. Devido a essas características, essas proteínas estão envolvidas em diversos processos celulares como a proteção contra o estresse celular, a apoptose, o remodelamento de proteínas desnaturadas, e o metabolismo energético (Liu et al., 2006). Sendo assim, a HSP70 pode ser induzida por diversos fatores como, isquemia, hipertermia, acúmulo de cálcio livre, estresse em filamento intermediário, depressão de ATP e glicogênio, estresse oxidativo e acidose, que podem estar presentes durante o exercício prolongado e também na atrofia induzida por imobilização (Liu, Steinacker, 2001).

Inicialmente, a expressão da proteína HSP70 foi confirmada no grupo controle dos animais transgênicos hiperexpressantes de HSP70, porém no grupo controle dos animais WT a expressão dessa proteína não foi detectável (Miyabara et al., 2006). Este resultado está de acordo com o fato de que em situação basal, a HSP70 apresenta baixos níveis de expressão (Liu et al., 2006) que possivelmente a nossa metodologia não detectou. Com a imobilização, o aumento dos níveis de expressão da proteína HSP70 sugere que há uma tentativa de proteger o músculo do estresse causado pela imobilização (Senf et al., 2008). Essa alteração ocorreu em ambos os grupos de animais, porém o aumento foi mais significativo nos animais WT,

sugerindo que a agressão causada pela imobilização foi maior nestes animais por estarem menos protegidos (com níveis menores de expressão de HSP70) do que os animais HSP70.

Quanto ao peso corporal e muscular, nossos resultados demonstraram que os grupos HSP70 apresentaram peso corporal e muscular inferiores quando comparados aos seus respectivos pesos dos grupos WT. Este dado está de acordo com estudos prévios que demonstraram que animais hiperexpressantes de HSP70 apresentam peso corporal e muscular reduzidos quando comparados aos dos animais selvagens, entretanto, as causas dessa redução de peso ainda não são conhecidas (Mcardle et al., 2004; Miyabara et al., 2006). Além disso, o músculo EDL não apresentou alterações no peso muscular de todos os grupos WT e HSP70. Estudos têm demonstrado que o músculo EDL atrofia após períodos prolongados de desuso ou quando exposto a situações severas como a desnervação por esmagamento (Hanson et al., 2005, 2010; Stelzer, Widrick, 2003). Portanto a ausência de alteração no peso do músculo EDL em nosso modelo de atrofia muscular poderia estar relacionada ao tempo de imobilização empregado (7 dias) e além disso o peso muscular é uma medida pouco refinada. Dessa forma, avaliamos se houve atrofia de forma mais específica através da determinação da AST das fibras musculares do SOL e EDL. O músculo EDL apresentou redução da AST somente das fibras musculares do tipo II, além disso, apenas os animais transgênicos apresentaram recuperação da AST 7 dias após imobilização. Sendo o EDL, um músculo de contração rápida constituído predominantemente por fibras musculares do tipo II (Freitas et al., 2002), nosso modelo experimental foi capaz de atingir grande parte de suas fibras musculares. Futuros estudos são necessários para investigar os mecanismos envolvidos nessa atrofia seletiva das fibras musculares do tipo II.

O músculo SOL apresentou peso muscular reduzido após imobilização por 7 dias nos animais WT e HSP70, indicando que protocolo de imobilização foi mais eficiente para este músculo (Darr, Schultz, 1989), porém somente os animais hiperexpressantes de HSP70 apresentaram recuperação da massa muscular após imobilização. Em contraste com a ausência de recuperação da massa muscular nos animais WT atrofiados, a hiperexpressão de HSP70 possivelmente garantiu a recuperação da massa muscular após atrofia. Além disso, o peso seco do SOL permaneceu inalterado somente nos animais transgênicos hiperexpressantes de HSP70. Isso pode estar associado à atenuação da perda de massa muscular mostrada nos animais HSP70 durante a imobilização, portanto, as HSPs podem ter retardado a atrofia muscular durante o desuso através da manutenção da síntese proteica e diminuição da taxa de degradação proteica. Considerando que a HSP70 se liga a polissomos recém-sintetizados e os guia através do canal ribossomal (Ku et al., 1995; Nelson et al., 1992) e, também participa do

processo de iniciação da tradução (Thomason, 1998); a hiperexpressão de HSP70 pode estar associada à manutenção da síntese de proteínas por sustentar a taxa de elongação de polipeptídeos.

Com relação à degradação proteica é sabido que, a atrofia muscular induzida por imobilização é acompanhada por estresse oxidativo em fibras musculares (Powers et al., 2005; Sen et al., 1992). O aumento do estresse oxidativo promove rápida proteólise no músculo esquelético, pois as proteínas que são oxidadas ficam suscetíveis ao ataque proteolítico (Dean et al., 1997) e sendo assim, altos níveis de HSP70 poderiam reduzir ou prevenir essa atividade proteolítica por se ligar às proteínas modificadas por oxidação e auxiliar no seu remodelamento (Locke et al., 1995).

Considerando que as células satélites possuem um papel essencial na regulação do trofismo muscular e na manutenção da massa muscular (Ciciliot, Schiaffino, 2010; Hawke, Garry, 2001), a diminuição do número de células satélites é uma manifestação comum em casos de atrofia muscular (Darr, Schultz, 1989; Mozdziak et al., 2000). Nossos resultados sugerem que a hiperexpressão de HSP70 poderia promover proteção contra a redução do número de células satélites após imobilização, contribuindo para a atenuação da atrofia e melhor recuperação da massa muscular. Sendo as células satélites importantes para a manutenção da massa muscular (Hawke, Garry, 2001), a regulação das células satélites via HSP70 poderia contribuir para o equilíbrio da massa muscular. A hipótese de uma possível regulação das células satélites via HSP70 está de acordo com Kamanga-Sollo et al. (Kamanga-Sollo et al., 2011) que demonstraram que o aumento da expressão de HSP70 induzido por estresse térmico induz a proliferação de células satélites. Além disso, Liu et al. (Liu et al., 2006) também apontaram uma provável interferência da HSP70 sobre as células satélites, pois esta poderia ter a habilidade de facilitar a miogênese através de ativação de células satélites, porém novos estudos são necessários para se esclarecer a influência das HSPs sobre as células satélites.

Os resultados de contração tetânica máxima não apresentaram alterações significativas no músculo EDL, o que sugere que a atrofia seletiva das fibras musculares do tipo II não refletiu em comprometimento da força tetânica máxima. Porém, o músculo SOL apresentou redução da força tetânica máxima nos animais WT no grupo imobilizado por 7 dias e não foi observada recuperação da força muscular após 7 dias de recuperação, resultado este que corrobora os dados de peso muscular e área de secção transversal, uma vez que a diminuição da massa muscular indica comprometimento das proteínas que compõem a fibra muscular, e portanto o comprometimento da força muscular (Cao et al., 2005). Por outro lado, o grupo

HSP70 não apresentou alteração da contração tetânica máxima após a imobilização, o que está de acordo com trabalhos que têm demonstrado a prevenção da redução da força muscular em indivíduos idosos através da hiperexpressão de HSP70 e HSP10, pois essas proteínas têm a capacidade de reduzir os níveis de proteínas mitocondriais oxidadas (Kayani et al., 2010; Mcardle et al., 2004).

Como o músculo EDL demonstrou pouca alteração frente à imobilização (Hanson et al., 2005; Hanson et al., 2010; Stelzer, Widrick, 2003), os experimentos de biologia molecular no intuito de se investigar os mecanismos intracelulares envolvidos foram realizados somente com o músculo SOL.

Os genes Atrogin-1 e MuRF-1, elementos chave no processo de degradação de proteínas por meio do sistema Ubiquitina-proteassoma e, portanto, considerados marcadores de atrofia muscular tiveram sua expressão elevada na fase aguda de atrofia (24 horas e 48 horas) (Bodine, 2001; Latres, 2005; Senf, 2008), resultado este que corrobora com Baptista et al., (2010) , que observou aumento na expressão desses genes no músculo sóleo em 48 horas e 3 dias após imobilização em ratos wistar. A atenuação da atrofia muscular observada nos animais hiperexpressantes de HSP70 poderia estar relacionada com a inibição da expressão de Atrogin-1 e MuRF-1, via regulação dos fatores de transcrição NF-kB e FOXO (Senf et al., 2008, 2010), uma vez que os animais hiperexpressantes de HSP70 não apresentaram alteração na expressão dos genes Atrogin-1 e MuRF-1 no processo de atrofia induzida por imobilização.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a HSP70 está envolvida na melhor recuperação estrutural e funcional do músculo após imobilização, o que poderia estar relacionado à preservação da quantidade de células satélites e à regulação de genes chave para o processo de atrofia muscular como Atrogin-1 e MuRF-1.

REFERENCIAS¹

- Akimoto T, Nonaka T, Harashima K, Sakurai H, Ishikawa H, Mitsuhashi N. Radicicol potentiates heat-induced cell killing in a human oesophageal cancer cell line: the Hsp90 chaperone complex as a new molecular target for enhancement of thermosensitivity. *Int J Radiat Biol.* 2004;80(7):483-92.
- Baba Ha, Schmid KW, Schmid C, Blasius S, Heinecke A, Kerber S, Scheld HH, Bocker W, Deng MC. Possible relationship between heat shock protein 70, cardiac hemodynamics, and survival in the early period after heart transplantation. *Transplantation.* 1998;65(6):799-804.
- Bakkar N, Guttridge DC. NF-kappaB signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. *Physiol Rev.* 2010;90(2):495-511.
- Baptista IL, Leal ML, Artioli GG, Aoki MS, Fiamoncini J, Turri AO, Curi R, Miyabara EH, Moriscot AS. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. *Muscle Nerve.* 2010;41(6):800-8.
- Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:19-37.
- Benjamin IJ, Mcmillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 1998;83(2):117-32.
- Biressi S, Rando TA. Heterogeneity in the muscle satellite cell population. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21(8):845-54.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):1014-9.
- Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Jr., Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell.* 2004;119(2):285-98.
- Cao PR, Kim HJ, Lecker SH. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(10):2088-97.
- Carmeli E, Kodesh E, Nemcovsky C. Tetracycline therapy for muscle atrophy due to immobilization. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009;9(2):81-8.
- Cassano M, Quattrocelli M, Crippa S, Perini I, Ronzoni F, Sampaolesi M. Cellular mechanisms and local progenitor activation to regulate skeletal muscle mass. *J Muscle Res Cell Motil.* 2009;30(7-8):243-53.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Des.* 2010;16(8):906-14.

Clark KA, Mcelhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:637-706.

Collins PL, Hightower LE. Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat shock) mRNAs and proteins. *J Virol.* 1982;44(2):703-7.

Cornelison DD, Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol.* 1997;191(2):270-83.

Covault J, Sanes JR. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1986;102(3):716-30.

Dahlman JM, Bakkar N, He W, Guttridge DC. NF-kappaB functions in stromal fibroblasts to regulate early postnatal muscle development. *J Biol Chem.* 2010;285(8):5479-87.

Darr KC, Schultz E. Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation. *J Appl Physiol.* 1989;67(5):1827-34.

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997;324 (Pt 1):1-18.

Dedkov EI, Borisov AB, Wernig A, Carlson BM. Aging of skeletal muscle does not affect the response of satellite cells to denervation. *J Histochem Cytochem.* 2003;51(7):853-63.

Edelman DA, Jiang Y, Tyburski JG, Wilson RF, Steffes CP. Lipopolysaccharide Up-Regulates Heat Shock Protein Expression in Rat Lung Pericytes. *Journal of Surgical Research.* 2006;10.1016(.12.560):171-6.

Feldman DE, Frydman J. Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. *Curr Opin Struct Biol.* 2000;10(1):26-33.

Ferreira R, Neuparth MJ, Vitorino R, Appell HJ, Amado F, Duarte JA. Evidences of apoptosis during the early phases of soleus muscle atrophy in hindlimb suspended mice. *Physiol Res.* 2008;57(4):601-11.

Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Leger B, Russell AP. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch.* 2011;461(3):325-35.

Freitas EM, Dal MPS, Cruz-Hofling MA Da. Histochemical differences in the responses of predominantly fast-twitch glycolytic muscle and slow-twitch oxidative muscle to veratrine. *Toxicon.* 2002;40(10):1471-81.

Gebauer M, Zeiner M, Gehring U. Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects on refolding activity. *FEBS Lett.* 1997; 417(1):109-13.

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(25):14440-5.

Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von Den Hoff JW. Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev*. 2007;16(5):857-68.

Griffin TM, Valdez TV, Mestril R. Radicicol activates heat shock protein expression and cardioprotection in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(3):H1081-8.

Hanson AM, Ferguson VL, Simske SJ, Cannon CM, Stodieck S. Comparison of tail-suspension and sciatic nerve crush on the musculoskeletal system in young-adult mice. *Biomed Sci Instrum*. 2005;4192-6.

Hanson AM, Stodieck LS, Cannon CM, Simske SJ, Ferguson VL. Seven days of muscle re-loading and voluntary wheel running following hindlimb suspension in mice restores running performance, muscle morphology and metrics of fatigue but not muscle strength. *J Muscle Res Cell Motil*. 2010;31(2):141-53.

Harridge SD. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. *Exp Physiol*. 2007;92(5):783-97.

Hawke TJ e DJ Garry. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*. 2001;91(2):534-51.

Hikida RS, Van Nostran S, Murray JD, Staron RS, Gordon SE e Kraemer WJ. Myonuclear loss in atrophied soleus muscle fibers. *Anat Rec*. 1997;247(3):350-4.

Howley ET. *Fisiologia do Exercício*. São Paulo: Manole; 2005. 598 p.

Jackman RW, SC Kandarian. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(4):C834-43.

Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 2005;33(5):745-64.

Jejurikar SS, Kuzon WM, Jr. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. Apoptosis. 2003;8(6):573-8.

Jensen RE, Johnson AE. Protein translocation: is Hsp70 pulling my chain? *Curr Biol*. 1999;9(20):R779-82.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica*. São Paulo: Guanabara Koogan; 2008.

Kamanga-Sollo E, Pampusch MS, White ME, Hathaway MR, Dayton WR. Effects of heat stress on proliferation, protein turnover, and abundance of heat shock protein messenger ribonucleic acid in cultured porcine muscle satellite cells. *J Anim Sci*. 2011;89(11):3473-80.

Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2006;33(2):155-65.

Karagounis LG, Hawley JA. Skeletal muscle: increasing the size of the locomotor cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(9):1376-9.

Kayani AC, Close GL, Dillmann WH, Mestril R, Jackson MJ, Mcardle A. Overexpression of HSP10 in skeletal muscle of transgenic mice prevents the age-related fall in maximum tetanic force generation and muscle Cross-Sectional Area. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;299(1):R268-76.

Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*. 2002;92(5):2177-86.

Ku Z, Thomason DB. Soleus muscle nascent polypeptide chain elongation slows protein synthesis rate during non-weight-bearing activity. *Am J Physiol*. 1994;267(1 Pt 1):C115-26.

Ku Z, Yang J, Menon V, Thomason DB. Decreased polysomal HSP-70 may slow polypeptide elongation during skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol*. 1995;268(6 Pt 1):C1369-74.

Latres E, Amini AR, Amini AA, Griffiths J, Martin FJ, Wei Y, Lin HC, Yancopoulos GD, Glass DJ. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(4):2737-44.

Lecker SH. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting: multiple parallel pathways? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003;6(3):271-5.

Li GC. Induction of thermotolerance and enhanced heat shock protein synthesis in Chinese hamster fibroblasts by sodium arsenite and by ethanol. *J Cell Physiol*. 1983;115(2):116-22.

Li GC, Laszlo A. Amino acid analogs while inducing heat shock proteins sensitize CHO cells to thermal damage. *J Cell Physiol*. 1985;122(1):91-7.

Lieber RL. Skeletal muscle structure, function & plasticity: the physiological basis of rehabilitation. Lippincott: Williams e Wilkins; 2002b. 369 p.

Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem*. 1986;55:1151-91.

Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*. 1988;22:631-77.

Liu Y, Gampert L, Nething K, Steinacker JM. Response and function of skeletal muscle heat shock protein 70. *Front Biosci*. 2006;11:2802-27.

Liu Y, Steinacker JM. Changes in skeletal muscle heat shock proteins: pathological significance. *Front Biosci*. 2001;6:D12-25.

Locke M, Tanguay RM, Klabunde RE, Lanuzzo CD. Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP 72. *Am J Physiol*. 1995;269(1 Pt 2):H320-5.

Macintosh B, Gardiner PF, McComas AJ. Skeletal muscle form and function. Champaign, IL Human Kinetics; 2006. 423 p.

Marber MS, Mestrl R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest.* 1995;95(4):1446-56.

Matsakas A, Patel K. Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histology and histopathology.* 2009;24(5):611-29.

Mcardle A, Dillmann WH, Mestrl R, Faulkner JA, Jackson MJ. Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. *FASEB J.* 2004;18(2):355-7.

Miller KJ, Thaloor D, Matteson S, Pavlath GK. Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278(1):C174-81.

Mitchell PO, Pavlath GK. Skeletal muscle atrophy leads to loss and dysfunction of muscle precursor cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(6):C1753-62.

Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS, Mestrl R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(4):C1128-38.

Moresi S, Adam JJ, Rijcken J, Kuipers H, Severens M, Van Gerven PW. Response preparation with adjacent versus overlapped hands: a pupillometric study. *Int J Psychophysiol.* 2010;79(2):280-6.

Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem.* 1997;32:17-29.

Mozdziak PE, Pulvermacher PM, Schultz E. Unloading of juvenile muscle results in a reduced muscle size 9 wk after reloading. *J Appl Physiol.* 2000;88(1):158-64.

Murphy KT, Cobani V, Ryall JG, Ibebunjo C, Lynch GS. Acute antibody-directed myostatin inhibition attenuates disuse muscle atrophy and weakness in mice. *Journal of applied physiology.* 2011;110(4):1065-72.

Murton AJ, D Constantin D, Greenhaff PL. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782(12):730-43.

Naito H, Powers SK, Demirel HA, Sugiura T, Dodd SL, Aoki J. Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J Appl Physiol.* 2000;88(1):359-63.

Nelson RJ, Ziegelhoffer T, Nicolet C, Werner-Washburne M, Craig EA. The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell.* 1992;71(1):97-105.

Norton PM, Latchman DS. Levels of the 90kd heat shock protein and resistance to glucocorticoid-mediated cell killing in a range of human and murine lymphocyte cell lines. *J Steroid Biochem.* 1989;33(2):149-54.

Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet.* 1993;27:437-96.

Pehme A, Alev K, Kaasik P, Julkunen A, Seene T. The effect of mechanical loading on the MyHC synthesis rate and composition in rat plantaris muscle. *Int J Sports Med.* 2004;25(5):332-8.

Pette D. Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2001;90(3):1119-24.

Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech.* 2000;50(6):500-9.

Pilon M, Schekman R. Protein translocation: how Hsp70 pulls it off. *Cell.* 1999;97(6):679-82.

Plesset J, Palm C, McLaughlin CS. Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;108(3):1340-5.

Powers SK, Howley ET. *Fisiologia do exercicio.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. 598 p.

Powers SK, Kavazis AN, Deruisseau KC. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(2):R337-44.

Ritossa F. A new puffing pattern induced and temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia.* 1962;18:571-573.

Sacheck JM, Ohtsuka A, McLary SC, Goldberg AL. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287(4):E591-601.

Salvini TF, Morini CC, Selistre HS De A, Ownby CL. Long-term regeneration of fast and slow murine skeletal muscles after induced injury by ACL myotoxin isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) venom. *Anat Rec.* 1999;254(4):521-33.

Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda).* 2008;23:160-70.

Santoro MG. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol.* 2000;59(1):55-63.

Schoenfeld BJ. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *J Strength Cond Res.* 2010;24(10):2857-72.

Segal SS, Faulkner JA. Temperature-dependent physiological stability of rat skeletal muscle in vitro. *Am J Physiol.* 1985;248(3 Pt 1):C265-70.

Selsby JT, Dodd SL. Heat treatment reduces oxidative stress and protects muscle mass during immobilization. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289(1):R134-9.

Sen CK, Marin E, Kretzschmar M, Hanninen O. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J Appl Physiol.* 1992;73(4):1265-72.

Senf SM, Dodd SL, Judge AR. FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;298(1):C38-45.

Senf SM, Dodd SL, Mcclung JM, Judge AR. Hsp70 overexpression inhibits NF-kappaB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. *FASEB J.* 2008;22(11):3836-45.

Silva LH, Silva MT, Gutierrez RM, Conte TC, Toledo CA, Aoki MS, Liebano RE, Miyabara EH. GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. *Lasers Med Sci.* 2011;27(5):993-1000.

Stelzer JE, Widrick JJ. Effect of hindlimb suspension on the functional properties of slow and fast soleus fibers from three strains of mice. *J Appl Physiol.* 2003;95(6):2425-33.

Tajsharghi H. Thick and thin filament gene mutations in striated muscle diseases. *Int J Mol Sci.* 2008;9(7):1259-75.

Ten Broek RW, Grefte S, Von Den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol.* 2010;224(1):7-16.

Thomason DB. Translational control of gene expression in muscle. *Exerc Sport Sci Rev.* 1998;26:165-90.

Tiidus PM. Skeletal muscle damage and repair. Champaign, IL: Human Kinetics; 2008. 337 p.

Touchberry CD, Gupte AA, Bomhoff GL, Graham ZA, Geiger PC, Gallagher PM. Acute heat stress prior to downhill running may enhance skeletal muscle remodeling. *Cell Stress Chaperones.* 2012;17(6):693-705.

Van Der Meer SF, Jaspers RT, Degens H. Is the myonuclear domain size fixed? *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2011;11(4):286-97.

Wernig A, Salvini TF, Langenfeld-Oster B, Irintchev A, Dorlöchter M. In *Plasticity of Motoneuronal Connections. (Endplate and motor unit remodeling in vertebrate muscles).* Amsterdam: Elsevier; 1991. 100 p.

Wozniak AC, Kong J, Bock E, Pilipowicz O, Anderson JE. Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: markers, models, stretch, and potential alternate pathways. *Muscle Nerve*. 2005;31(3):283-300.

Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:441-69.

Zhao J, Brault JJ, Schild A, Goldberg AL. Coordinate activation of autophagy and the proteasome pathway by FoxO transcription factor. *Autophagy*. 2008;4(3):378-80.

Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*. 1998;94(4):471-80.