

O PROCESSO DE PADRONIZAÇÃO EXPERIMENTAL PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS DE ESTRESSE NO EXERCÍCIO FÍSICO

Joaquim Maria Ferreira Antunes Neto¹,
Bruna Bergo Nader¹,
Denise Vaz de Macedo²

RESUMO

O processo de padronização, reprodutibilidade, desenvolvimento e análise de resultados em pesquisas laboratoriais que envolvem experimentos de bancada é tarefa complexa. A multidisciplinaridade possível entre a Educação Física e demais áreas das ciências biológicas tem levado muitos alunos a partirem para os estudos de pós-graduação em institutos de ciências básicas. Contudo, as práticas de investigação científica, muitas vezes, não fazem parte da rotina de pesquisa em Faculdades de Educação Física. O objetivo deste estudo é reconstruir procedimentos de uma área instigante de pesquisa – as proteínas de estresse como marcadores de estresse oxidativo – em uma dimensão didática para quem deseja lançar-se a novos desafios de investigação.

Palavras-chave: Método científico, Proteínas de estresse, Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The standardizing experimental process to detect stress proteins in physical exercise

The process of standardization, reproducibility, development and analysis of results in laboratory experiments involving bench is a complex task. The possible multidisciplinary between physical education and other areas of biological sciences had led many students for studies in basic science. However, the practices of scientific research often are not part of routine research on colleges of Physical Education. The aim of this study is to reconstruct an area instigating procedures for research – stress proteins as markers of oxidative stress – in a didactic dimension for those who want to launch new research challenges.

Key words: Scientific method, Stress proteins, Oxidative stress.

1-Curso de graduação de Fisioterapia, Instituto de Ensino Superior de Itapira – IESI

2-Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

E-mail:
joaquim_netho@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

As pesquisas voltadas para a compreensão de fenômenos moleculares adaptativos, sobretudo na área da Educação Física, passaram a ter um caráter transdisciplinar nos anos de 1990.

Os programas de pós-graduação das ciências ditas básicas, como a Biologia e Medicina, principalmente, proporcionaram a entrada de alunos ao mestrado e doutorado com frequência jamais vista.

Antes, o que se observava eram as Faculdades de Educação Física oferecerem cursos de pós-graduação *stricto sensu* em áreas específicas das ciências biológicas, tais como Fisiologia do Exercício, Biomecânica, Treinamento Desportivo e Saúde Coletiva. Hoje, os próprios núcleos de ciências básicas chegam a ter laboratórios voltados aos estudos dos efeitos do exercício físico sistematizado no organismo humano. Como exemplo, cito minha formação no doutorado, cursado no Departamento de Bioquímica, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Creio ser aluno da primeira geração ingressante no programa de doutorado neste Departamento. Na época, em 1998, os estudos do meu laboratório estavam voltados para análises que buscavam compreender mecanismos básicos de regulação do processo de respiração mitocondrial. Um ano após, o laboratório tem seu nome alterado e passa a ser chamado de “Laboratório de Bioquímica do Exercício – LABEX”, coordenado pela Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, precursora no país em desenvolvimento de pesquisas que pudessem determinar qual seria o “limiar de estresse” ao qual atletas de alto rendimento teriam condições de permanecer em níveis elevados de esforço físico, porém com respaldo de uma metodologia científica identificadora do início de um quadro de estresse oxidativo.

Os meus estudos no mestrado foram de natureza biológica, mas sem instrumentalização metodológica que um departamento voltado para as mais diversas condições moleculares poderia me oferecer. Portanto, tenho como objetivo relatar o meu caminho metodológico para detecção das proteínas de estresse (heat shock proteins – HSPs). Tal classe de proteína, que já vinha sendo investigada em experimentação animal

envolvendo tecido muscular (Smolka et al., 2000) e se mostrado como um marcador importante de nível de estresse oxidativo, agora seria estudada no sangue em procedimento inovador para o LABEX.

Objetivo maior é mostrar que qualquer plano de conhecimento precisa ser socializado com a comunidade, no nosso caso a acadêmico-científica. Não há razão, no meu ponto de vista, de camuflar a metodologia de um estudo científico e seus passos por meio de estratégias que não facilitam a reprodutibilidade de um experimento.

Primeiro passo: o conceito - o que são proteínas de estresse e estresse oxidativo

As HSPs são proteínas constitutivas, ou seja, encontram-se em quantidades limitantes, porém disponibilizadas em células nucleadas em condições normais de funcionamento de nosso organismo. Locke e colaboradores (1990) descrevem que células de todos os organismos respondem a uma variedade de condições estressoras através de uma rápida transcrição e subsequente tradução de proteínas altamente conservadas ao longo do processo evolutivo, que são as HSPs.

Welch (1993) complementa que o termo “proteína de estresse” tem caráter genérico na descrição de eventos biológicos, uma vez que diferentes estímulos podem induzir o mesmo mecanismo de defesa celular. As HSPs surgem na literatura como uma das classes de proteínas de estresse melhor estudadas.

O aumento na expressão das HSPs foi inicialmente evidenciado em *Drosophila melanogaster* (Ritossa, 1962), por meio de choque térmico (incubação em diferentes temperaturas elevadas). Hoje já se conhece que a resposta heat shock é uma propriedade geral de todas as células, tanto em condição de hipertermia quanto de demais estados de alteração homeostática, tais como exposição a metais pesados, aumento na concentração de cálcio intracelular, diminuição de glicose para fornecimento de energia às células, infecções virais e bacterianas, hipóxia, análogos de aminoácidos, aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), presença de toxinas, etc. (Schlesinger, 1986; Bienz, Pelham, 1987; Welch, 1992; Yellon, Marber, 1994).

As HSPs são de fundamental importância para a sobrevivência das células,

não apenas em condição de estresse, onde se vê aumento na síntese de proteínas dirigidas à reparação de danos celulares, mas também em eventos de transporte e enovelamento (folding) de proteínas em formação (Neupert e colaboradores, 1990; Gething, Sambrook, 1992; Craig, 1993; Morimoto, 1993; Stuart e colaboradores, 1994; Terlecky, 1994).

Por isso, são também denominadas de “chaperonas moleculares” (Flaherty e colaboradores, 1990; Hendrick, Hartl, 1993; Hall, 1994).

As chaperonas moleculares têm como função principal assistir a auto-formação e enovelamento de cadeias polipeptídicas, por inibição de vias alternativas de ligação de outras proteínas às cadeias que se formam, auxiliando na não formação destas interações incorretas (Ellis, Van Der Viés, 1991).

Vigh e equipe (1998) sugeriram também que alterações nas propriedades físicas (fluidez e viscosidade) de membranas biológicas pelo aumento na temperatura interna poderiam influenciar a expressão de genes heat shock. Contudo, esta resposta homeostática de organização da membrana parece ser transitória, com duração de poucas horas; o acúmulo de HSPs específicas nas regiões de alteração induziria um aumento na rigidez da membrana, a fim de que esta possa recuperar suas características normais de fluidez; após o restabelecimento das condições pré-estresse, a membrana inativaria os sinais de perturbação e finalizaria a síntese de HSPs.

Nesse sentido, Ryan e colaboradores (1991) propuseram que a quantidade de proteínas de estresse HSP70 sintetizadas parece ser dependente da severidade do estresse submetido ao organismo e do nível celular de HSPs existente anteriormente à condição de estresse. Postularam também que a síntese de HSP70 em células expostas ao calor sofre uma redução quando as mesmas células são subseqüentemente expostas a um segundo estresse térmico.

Tal condição adaptativa foi chamada de termotolerância adquirida (Gerner, Scheneider, 1975), sendo uma importante resposta de regulação térmica ambiental nos mamíferos. O início da atenuação das alterações celulares que podem ser induzidas pelo calor excedente parece ser dependente da presença de HSPs constitutivas no estado

pré-estresse (Li e colaboradores, 1983; Craig, 1985).

Em condições homeostáticas normais as HSPs estão ligadas ao fator heat shock (HSF), tal como apresentado na Figura 1 (estágio 1). O HSF pode ser definido como um fator de ativação transcricional, presente no citoplasma em estado monomérico e sem atividade de ligação ao DNA. Em resposta a hipertermia ou a outra condição de estresse há um aumento de proteínas desnaturadas no citoplasma, induzindo um desacoplamento do complexo HSP-HSF. O desacoplamento ocorre em virtude das HSPs constitutivas buscarem ligação com as proteínas desnaturadas, pois sua função é prevenir que tais proteínas desnaturadas agreguem-se em interações deletérias com outras proteínas, que poderiam ocasionar uma condição de estresse maior (estágio 2). Contudo, para que o HSF desencadeie o processo de síntese das HSPs, ele deve adentrar-se no núcleo celular e ligar-se ao elemento heat shock (HSE); a entrada do HSF no núcleo só é possível através de sua transição de um estado monomérico (desativado) para um estado oligomérico (ativado) (estágio 3). As HSPs regulam o estado de oligomerização do HSF (e assim sua capacidade de ligar-se ao DNA), através da ocultação da superfície de trimerização; uma vez havendo a ligação das HSPs constitutivas com proteínas desnaturadas no citoplasma, a superfície de trimerização fica exposta, tornando possível a formação de trímeros de HSF. Em um estágio subseqüente, ocorre a entrada destes trímeros no núcleo e a imediata ligação aos HSEs do DNA, ativando a transcrição das HSPs (estágio 4). A síntese de HSPs induzida por um estado de hipertermia é proporcional a duração e severidade do estresse (Storti e colaboradores, 1980; Didomenico e colaboradores, 1982; Lindquist, 1986; Sorger, 1991; Morimoto, 1993; Feige, Polla, 1994).

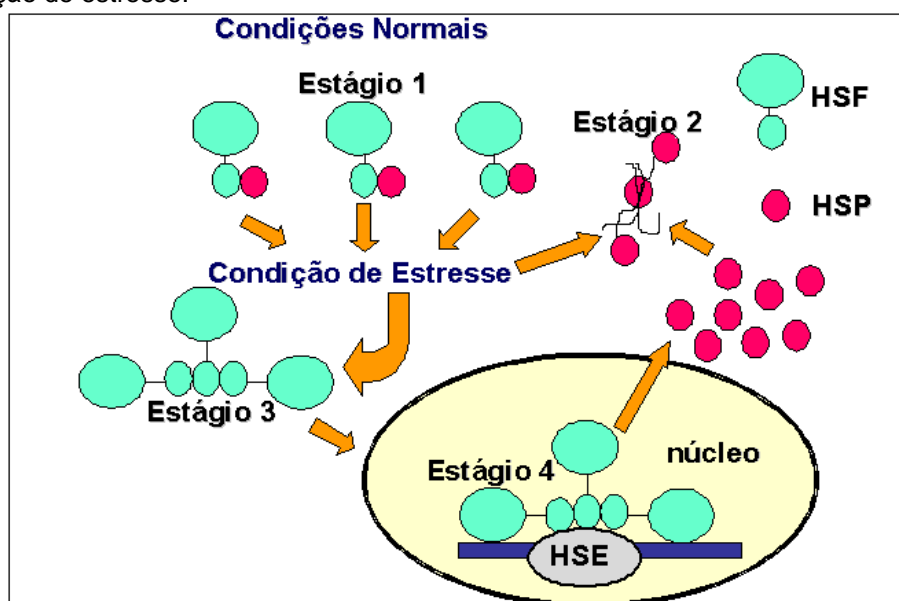
A sobrevivência celular frente ao ataque dos radicais livres dependerá de um equilíbrio entre os processos de produção e de eliminação das espécies reativas. Radicais livres são espécies químicas independentes, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Isto implica em uma grande instabilidade e, freqüentemente, elevada reatividade. Como necessitam completar seus pares de elétrons para se estabilizarem, comportam-se ou como receptores (oxidantes)

ou como doadores (redutores) de elétrons. Nesta definição incluem-se os átomos de hidrogênio, vários íons metálicos de transição (ferro e cobre) e o oxigênio molecular (Halliwell, Gutteridge, 1989).

Qualquer circunstância que desequilibre estes dois processos induzirá a

instalação de uma condição chamada de estresse oxidativo, quando prevalecerá a formação de oxidantes aos antioxidantes (Alessio, 1993). Neste caso, o acúmulo de reações de oxidação pode induzir alterações severas em várias estruturas celulares.

Figura 1 - Modelo especulativo para a ativação do fator heat shock (HSF) e síntese de HSPs em condição de estresse.



Existem evidências também que EROs, numa condição de estresse oxidativo, poderiam também participar como sinalizadores na síntese de HSPs (Welch, 1992). Hernando e Manso (1997) relataram que ratos sedentários submetidos ao exercício intenso tiveram aumentos significativos de HSP72 no músculo sóleo.

Locke e colaboradores (1990) também mostraram que o estresse induzido por um exercício exaustivo em esteira seria um estímulo suficiente para induzir síntese de HSP72 e HSP90 em células do músculo sóleo, do baço e em linfócitos. Dado o potencial das EROs danificarem proteínas intracelulares durante contrações musculares repetitivas, foi sugerido que quando essa produção exceder a capacidade de defesa, a síntese de HSPs poderia complementar a defesa enzimática antioxidante pré-existente do organismo (Essig, Nosek, 1997).

Nesse sentido, Antunes Neto e colaboradores (2006) mostraram aumento na concentração de proteínas carboniladas e

diminuição na atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutatona redutase em leucócitos totais de ratos sedentários duas horas após um protocolo de exercício exaustivo, indicando que a exaustão estava relacionada com um aumento nos níveis de estresse oxidativo. Nesse mesmo tempo, detectou-se aumento significativo na expressão de HSP72 no músculo sóleo, reforçando a idéia de que a síntese de HSP poderia ser um mecanismo complementar de proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo exercício quando o sistema enzimático antioxidante está com sua atividade diminuída (Smolka e colaboradores, 2000).

A sinalização para a síntese de HSPs seria, possivelmente, a exposição de aminoácidos hidrofóbicos das próprias enzimas da defesa; os aminoácidos hidrofóbicos atuariam como regiões de ligação às HSPs, sinal para a síntese de mais proteínas de estresse.

Segundo passo: preparo das amostras para detecção das hsp

O tema desenvolvido no doutorado foi “Estudo da Relação entre Estresse Oxidativo e Síntese de Proteínas HSP70 no Sangue de Animais Submetidos a Diferentes Níveis de Exercício Físico”.

Os procedimentos metodológicos a serem apresentados levarão em conta a experimentação animal. Foram utilizados ratos “wistar” submetidos a três diferentes protocolos de exercício físico em esteira rolante: única sessão de exercício exaustivo (Antunes Neto e colaboradores, 2006), treinamento contínuo induzindo overtraining (Antunes Neto e colaboradores, 2008a) e treinamento intermitente induzindo overtraining (Antunes Neto e colaboradores, 2008b).

Os passos, apresentados a seguir, não foram detalhados nos respectivos artigos, mas as estratégias de treinamento tiveram grande clareza descritiva. Muitos pesquisadores entram em contato buscando maiores detalhes sobre os procedimentos de bancada. Tais pormenores é que não conseguimos esclarecer no corpo de um artigo.

Obtenção da Amostra

Após o animal ter sido anestesiado com hidrato de cloral (10%) via intraperitoneal, realizamos uma secção abdominal de forma que pudéssemos alcançar a veia hepática e coletar todo o sangue possível, que era depositado em tubos heparinizados.

O animal, após a extração de sangue, era sacrificado por deslocamento cervical. Para o preparo das amostras, 2/3 do sangue total obtido de cada animal era reservado para o isolamento dos leucócitos totais. Plasma e hemáceas eram obtidos após centrifugação, por 10 min a 3000 rpm, do sangue restante.

O plasma obtido era separado e armazenado a -80°C após tratado com butilhidroxitolueno (BHT) 90M, este que atua como um seqüestrador específico de espécies reativas de oxigênio. Para a realização de duplicatas dos experimentos com plasma, alicotávamos os seguintes volumes: 40µL para análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, um procedimento para avaliação de peroxidação lipídica); 400µL para Proteína Carbonilada (PC, um procedimento para avaliação de oxidação protéica); 100µL para Grupo Sulfidril (GS, um composto

protéico fundamental na manutenção normalizada do estado antioxidante) 100µL para creatina quinase (CK, um indicador de alteração de permeabilidade de membrana celular); 300µL para as análises automatizadas (transaminase glutâmica oxaloacética-TGO; Ácido Úrico-AU; Creatinina-Cre; Uréia – marcadores de alterações fisiológicas). As hemáceas eram lavadas com solução gelada de tampão fosfato 0,1M com NaCl 0,9%, pH 7,4, e centrifugadas a 3000 rpm, desprezando-se em seguida o sobrenadante. O processo era repetido três vezes. Aliquotas de 500µL eram retiradas e hemolisadas com água destilada na proporção 1:1 (v/v), com posterior armazenamento a -80°C para as seguintes análises de enzimas antioxidantes: catalase (CAT); glutathione redutase (GR); hemoglobina (Hb).

Preparo das amostras de leucócitos totais para eletroforese

O sangue reservado para a preparação das amostras de leucócitos totais (2/3 do volume do sangue coletado) era misturado em volume proporcional a solução salina balanceada de Hanks (HBSS). Após, colocávamos para cada tubo de ensaio 3,5 mL de Histopaque (1119 - SIGMA Diagnostics) e 7 mL da mistura sangue-HBSS e centrifugávamos a 1500 rpm durante 30 min. Os leucócitos totais eram coletados e lavados 3 vezes com HBSS a 1500 rpm por 10 min cada lavagem. A Figura 2 apresenta o resultado do processamento de sangue total com Histopaque. As células eram lisadas em 400µL de tampão Tris-HCl (hidroximetil aminometano – ácido clorídrico) 0,18M (pH 6,8), contendo SDS (Dodecilsulfato de Sódio) 6,9%, glicerol 30%, DTT (Dithiothreitol) 0,2M, bromofenol blue 0,001%, uréia 6M, PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) 0,002M e EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) 0,005M.

Dosagem de proteínas das amostras de leucócitos totais

As proteínas totais das amostras de leucócitos foram dosadas pelo método de Bradford (1976), antes da colocação do tampão de lise. O método de dosagem de proteínas totais de Bradford é um procedimento clássico. Sua importância residiu em padronizar uma quantidade exata das amostras de leucócitos totais para confecção da eletroforese, a fim de certificar que o

aumento em tamanho da proteína estudada era resultado da indução de sua síntese protéica e expressão resultante do treinamento e não de um volume exorbitante plotado.

Terceiro passo: eletroforese para detecção de expressão das proteínas de estresse em leucócitos totais

A eletroforese em gel de poliacrilamida era realizada pelo método descrito por Laemli (1970). O gel de empacotamento tinha concentração de 5% de acrilamida, sendo 12,5% a concentração do gel de separação (running gel). As placas eram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque (Bio Rad, CA, USA) a 30% e N-N-metileno-bisacrilamida estoque (Bio Rad, CA, USA) a 0,8%, ambas dissolvidas em água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore - Water Corporation, MA, USA), filtradas em papel de filtro (Whatman número 1) e mantidas a 4°C em frasco âmbar. As eletroforeses SDS-PAGE eram realizadas em sistema SE 400 (16x14 cm) da Hoefer (CA, USA). A eletroforese ocorria utilizando-se tampão de corrida (Tris-HCL 0,025M, glicina 0,192M, SDS 0,1%, sendo o pH desta solução não acertado). A voltagem utilizada compreendia 90V e 200V (SE-400) para o gel de

empacotamento e gel de corrida, respectivamente.

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

Para a realização do "Western Blot", o gel não foi corado, passando diretamente para o procedimento de transferência para a membrana de nitrocelulose.

Padronização da Preparação de Amostras de Leucócitos Totais e da Técnica Eletroforética

Apesar de já termos apresentado as técnicas de preparação das amostras de leucócitos totais e de eletroforese, achamos conveniente relatar como se deu a padronização de todo o processo. O nosso primeiro passo foi padronizar a preparação das amostras de leucócitos totais. Para tanto, buscamos na literatura os métodos mais utilizados. A Tabela 1 apresenta os três métodos de preparação das amostras de leucócitos utilizados por nós em um primeiro momento.

Tabela 1 - Métodos de isolamento de leucócitos totais.

Locke e colaboradores, (1990) (Método 1)	Adaptado de Rao e colaboradores, (1999) (Método 2)	Ryan e colaboradores, (1991) (Método 3)
10 mL de sangue total diluídos em 3,5 mL de Ficoll-Hypaque	Diluição do sangue total em HBSS na proporção 1:1	20 mL de sangue total diluídos em 10 mL de Ficoll-Hypaque (1:0,5 - Ficoll:sangue)
Centrifugação: 1.300 rpm por 30/40 minutos	Diluição da mistura sangue: HBSS em Ficoll-Hypaque na proporção 1:0,5	Centrifugação 3.000 rpm por 30 minutos
Leucócitos coletados e lavados 3 vezes com PBS (1.300 rpm por 10 min)	Centrifugação: 400 x g por 30 min	Leucócitos coletados e lavados 3 vezes com HBSS (1.500 rpm por 5-7 minutos)
Células lisadas em 400 µL de tampão de Rodenhiser	Leucócitos coletados e lavados 3 vezes com HBSS (100 x g por 10 min)	Células lisadas em 400 µL de tampão de Laemli
	Células lisadas em 400 µL de tampão pesquisado em nosso Laboratório	

Tabela 2 - Tampões de amostra para diluição dos leucócitos totais, de acordo com os seus respectivos métodos de isolamento.

Tampão - Método 1	Tampão - Método 2	Tampão - Método 3
Uréia 9 M	Tampão Tris-HCl 0,18 M (pH 6,8)	Tampão Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8)
PMSF 0,001M	SDS 6,9%	SDS 2%
β -Mercaptoetanol 5%	Glicerol 30%	Glicerol 10%
0,001% Bromofenol Blue	DTT 0,2M	2-Mercaptoetanol 5%
	Bromofenol Blue 0,001%	Bromofenol Blue 0,001%
	Uréia 6 M	
	PMSF 0,002 M	
	EDTA 0,005 M	

A única diferença entre nossa forma de isolamento de leucócitos e os métodos apresentados na Tabela 1 encontra-se no tipo de agregador de leucócitos. Os métodos descritos relatam a utilização de Ficoll-Hypaque. O agregador de leucócitos utilizado em nossos experimentos foi Histopaque (1119 - SIGMA Diagnostics).

A Tabela 2 apresenta os tampões de amostra utilizados para a diluição dos leucócitos coletados, de acordo com os respectivos métodos vistos na tabela anterior.

A diferença essencial entre os métodos reside na diluição do sangue total.

O método de Rao e colaboradores (1999) utiliza solução salina balanceada de Hanks (HBSS) em diluição 1:1 (sangue:HBSS). Tal diluição parece facilitar a extração de leucócitos totais, ficando a "nuvem" de leucócitos menos impregnada de eritrócitos em relação a amostras obtidas diretamente da diluição entre sangue total e Histopaque.

Porém, quando se utiliza de HBSS não há a separação do plasma após centrifugação, pois HBSS e plasma ficam retidos na primeira camada de separação. Esta condição impossibilita a realização das análises dos marcadores plasmáticos de ataque oxidativo e metabólicos.

Desta forma, quando conseguíamos obter cerca de 12-14 mL de sangue total de cada animal, reservávamos 1/3 deste sangue obtido para uma centrifugação sem o tampão HBSS, coletando, assim, o volume plasmático. Em casos onde não obtínhamos tal volume de sangue total, optávamos pela extração de leucócitos totais com diluição direta 1:1 entre Histopaque e sangue total. O que torna evidente um método do outro é o tipo de tampão de amostra utilizado.

Resultados preliminares de nosso Laboratório (Smolka, 2000) mostraram que a

inclusão de Uréia 6M, para efetuar lise mais efetiva das proteínas, e de PMSF 0,002M e EDTA 0,005M, para melhor conservação da amostra (Método 2), proporcionavam uma melhor qualidade eletroforética quando as amostras ficavam armazenadas por um longo período. As amostras de leucócitos totais foram testadas em gel SDS-PAGE conforme o método de Laemli (1970).

Dosagem da concentração de proteínas totais das amostras foram feitas pelo método de Bradford (1976). Utilizamos concentrações de 5% para o gel de empacotamento e 12,5% para o gel de separação das proteínas (Tabela 3).

A eletroforese permite o isolamento de proteínas segundo sua carga elétrica e peso molecular. As eletroforeses SDS-PAGE foram realizadas em sistema SE 400 (16x14 cm) da Hoefer (CA, USA), com tampão de corrida Tris-HCL 0,025M, Glicina 0,192M e SDS 0,1%. A voltagem utilizada compreendeu 90V e 200V (SE-400) para o gel de empacotamento e gel de corrida, respectivamente.

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

Para a realização do "Western Blot", o gel não foi corado, passando diretamente para o procedimento de transferência para a membrana de nitrocelulose. Para testar e comparar a eficácia dos tampões de diluição das amostras dos diferentes métodos, realizamos procedimentos eletroforéticos com amostras de sangue de ratos.

A Figura 2 apresenta um padrão dos resultados obtidos.

Foram aplicados 25 μ L da amostra em cada coluna eletroforética. Mais uma vez

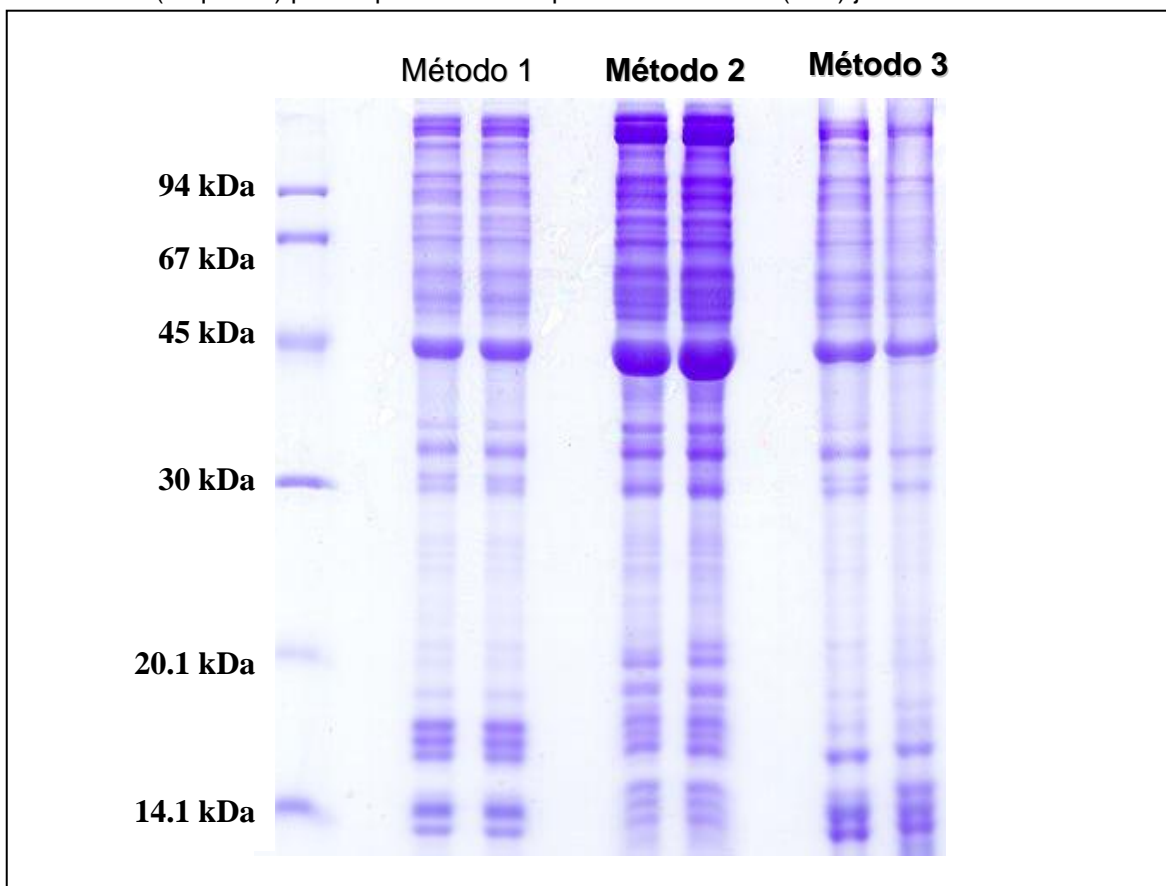
pareceu evidente que o Método 2 permitiu uma melhor conservação das propriedades protéicas. Da mesma forma, o Método 1 foi mais eficaz na conservação das proteínas do que o Método 3. Para confirmar os melhores resultados obtidos pelo Método 2 em

comparação ao Método 1, a Figura 3 traz uma eletroforese de concentração de proteínas, dosada a partir do método de Bradford (1976), com amostras que foram incubadas por 24 horas a 37°C.

Tabela 3 - Preparação do Gel SDS-PAGE.

	Gel 5%	Gel 12,5%
Acrilamida:Bis-Acrilamida (30:0,8)	1,67 mL	12,5 mL
Tris 1M pH 6.8	1,25 mL	11,2 mL
SDS 20%	0,05 mL	0,15 mL
H ₂ O destilada	7 mL	6,2 mL
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenidiamina)	15 µL	20 µL
(PSA) Persulfato de Amônia 0,1M	120 µL	250 µL

Figura 2 - Teste das amostras de leucócitos totais após armazenamento a -80° C durante 4 meses. A primeira coluna (esquerda) possui proteínas com pesos moleculares (kDa) já conhecidos.



Efetuamos a dosagem de proteínas antes da incubação, para que pudéssemos analisar quais seriam as alterações resultantes. Percebemos que o Método 2, novamente, assegurou uma melhor qualidade em resolução eletroforética, o que fica

evidente pela maior quantidade de proteínas conservadas após a incubação a 37°C.

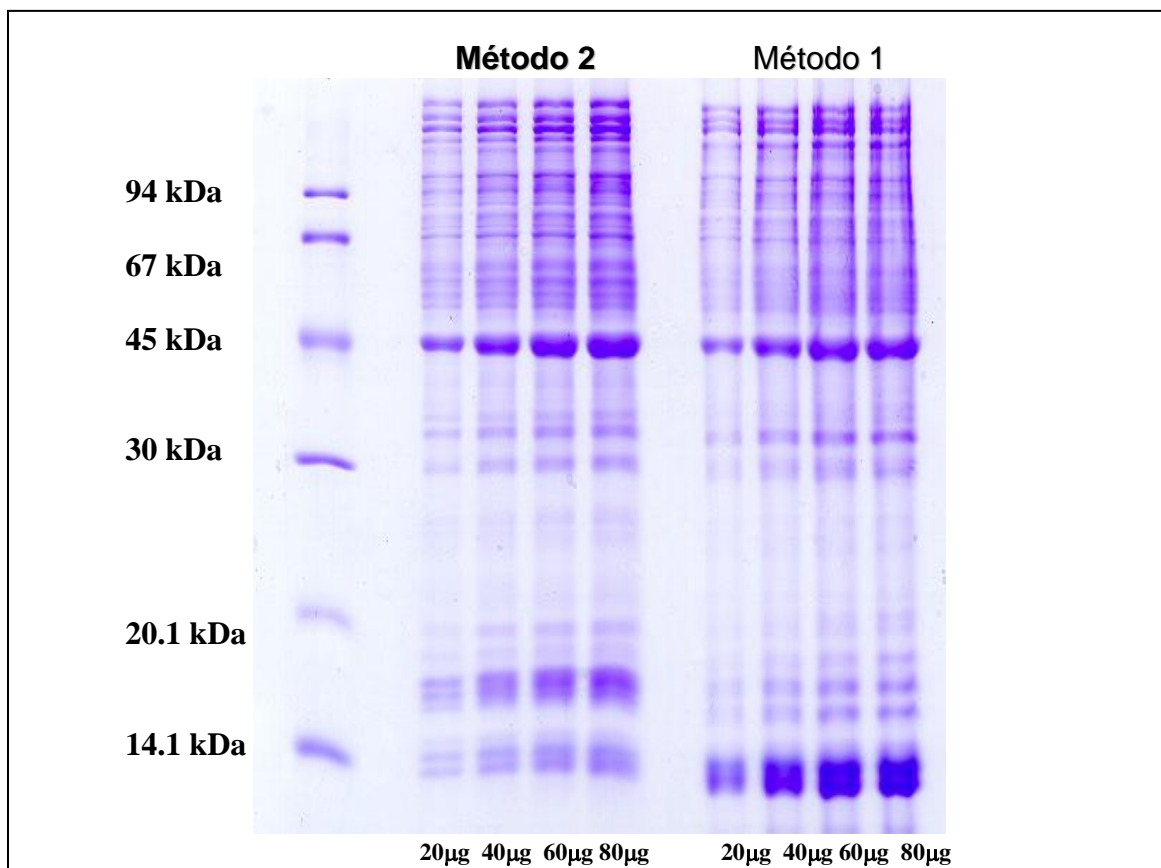
Quarto Passo: Técnica de Isolamento de Proteínas por Western Blot

A técnica de Western Blot permite que proteínas, separadas em gel de poliacrilamida,

possam ser transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose ou PVDF. As bandas transferidas são passíveis de análise por autoradiografia, imunodeteção e eluídas

para análise de aminoácidos ou seqüência da cadeia polipeptídica (Legendre, Matsudaira, 1988).

Figura 3 - Eletroforese de concentração de proteínas das amostras após incubação por 24 horas a 37°C.



O tampão de transferência era preparado com 2,2g de 3-ciclohexil-amino-1-ácido propanosulfônico (CAPS) em 900ml de água, com pH 11 acertado com NaOH 2N, e o volume final completado a 1 mL com 100mL de metanol. O gel era colocado sobre a membrana em suporte plástico e a transferência ocorria a 400mA por 60 min a 15°C em sistema refrigerado da série TE (Hofer,CA,USA).

Para a imunodeteção, a membrana era bloqueada com tampão (pH 7,6) Tris HCL 0,02M, NaCl 0,15M, Twen 0,05% (TBST), contendo 5% de leite em pó desnatado, por 12 horas em agitação suave e, em seguida, lavada 3 vezes com TBST (10 min cada lavagem) e incubada "overnight" com anticorpo policlonal contra HSP70 (SPA-810, StressGen,

Canadá), diluição 1:1000 em TBST. Em seguida, lavávamos a membrana 3 vezes com TBST, por 10 min cada lavagem. Como segundo anticorpo, era utilizado um anticorpo "anti-rabbit" conjugado com peroxidase (Bio Rad, CA, USA) diluído 1:2000 no tampão TBST, deixando-se incubar por 6 horas, seguido por 3 lavagens de 10 min com TBST. Para a revelação, diluímos 50mg do substrato 3-3' diaminobenzidina em 50 ml de tampão fosfato 0,1M com NaCl 0,9%, pH 7,4, e adicionamos 1mL de peróxido de hidrogênio 30%. Esta solução foi colocada em contato com a membrana até a definição visual da banda protéica em estudo. A reação de revelação era interrompida com a lavagem da membrana por H2O destilada. Análises densitométricas eram realizadas para

quantificação das HSPs, utilizando-se o Sharp-Scanner para aquisição de imagem e o programa "Image Master 1D Elite" (Amershan Pharmacia, Uppsala, Suécia) para análise e processamento dos dados. A seguir, apresentaremos HSPs isoladas em situação de exercício exaustivo, certificando que o tamanho, largura e densidade da banda protéica correlacionam-se com a severidade do estresse instalado (Figura 4).

Procuramos compreender inicialmente como se daria o comportamento dos marcadores de estresse oxidativo em um

organismo sedentário. Os ratos foram submetidos a uma única sessão de corrida em esteira rolante com inclinação de -3. Porém, antes da realização desta sessão de corrida, realizamos um período de adaptação (1 semana) do animal com o equipamento, onde eles chegaram a correr por 5 minutos numa velocidade de 10m/min. Esta semana inicial teve como finalidade separar os animais que corriam voluntariamente daqueles que se recusavam a correr.

Figura 4 - Expressão de HSPs e análise densitométrica decorrente de sessão de exercício exaustivo. Resultados de Antunes Neto e colaboradores (2006).

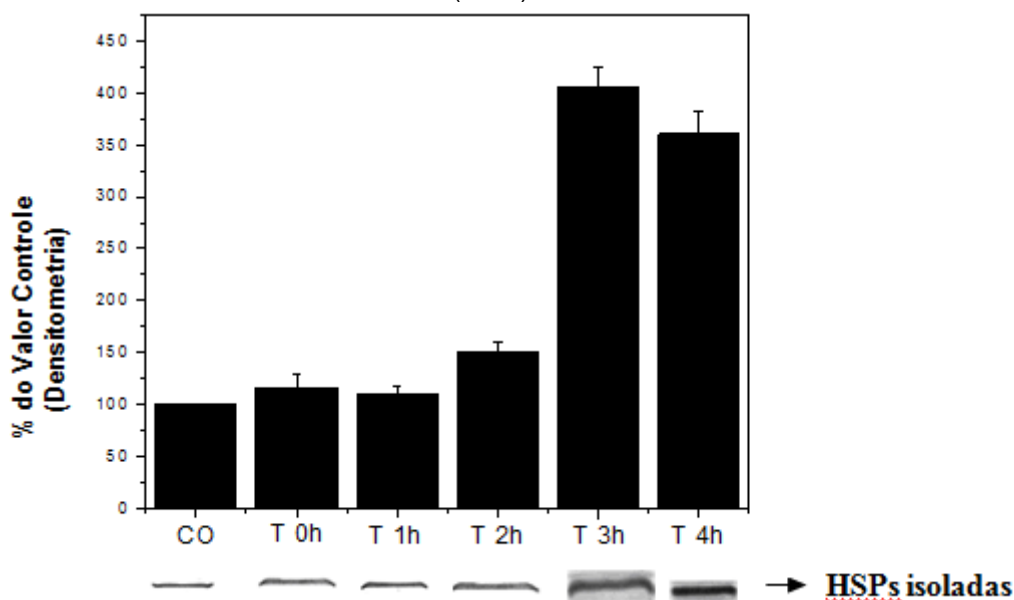


Tabela 4 - Protocolo de exercício agudo.

Tempo	Velocidade
0 - 5 minutos	10 m/min
5 - 15 minutos	15 m/min
15 - 25 minutos	20 m/min
25 - 45 minutos	25 m/min
45 - 60 minutos	30 m/min

No final deste período de adaptação, os animais foram divididos em 6 grupos, compostos cada grupo por 5 animais ($n = 5$): grupo controle sedentário (CO), grupo sacrificado imediatamente após a exaustão (T0h), grupo sacrificado 1 hora após a exaustão (T1h), grupo sacrificado 2 horas após a exaustão (T2h), grupo sacrificado 3 horas após a exaustão (T3h) e grupo

sacrificado 4 horas após a exaustão (T4h). Desta forma, tivemos a oportunidade de analisar o comportamento cinético dos marcadores estudados ao longo de 4 horas após o exercício agudo. O exercício de exaustão consistiu de atividade contínua e com intensidade progressiva em esteira rolante, com duração de 1 hora, conforme apresentado na Tabela 4. Os animais de cada

grupo foram sacrificados, para a coleta do sangue, de acordo com seus respectivos tempos de espera pós-corrida.

CONCLUSÃO

O estudo trouxe uma perspectiva do desenvolvimento da experimentação laboratorial não mostrada nos artigos científicos.

A possibilidade de reconstruir a metodologia de pesquisa empregada para o estudo de proteínas de estresse e elaborá-la passo a passo é uma contribuição inovadora, sobretudo, para alunos iniciantes nas práticas laboratoriais.

Um dos objetivos da pesquisa científica é a reprodutibilidade, que nem sempre é obtida com as informações geradas na sessão de Matérias e Métodos. Assim, minha experiência de quatorze anos atuando neste segmento do conhecimento torna-se mais ainda compartilhado com todos os pesquisadores da Educação Física.

REFERÊNCIAS

- 1-Alessio, H. M. Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 5. Num. 2. 1993. p. 218-224.
- 2-Antunes Neto, J. M. F.; Pereira-da-Silva, L.; Macedo, D. V. Heat shock proteins as oxidative stress markers in rats submitted to exhaustive intermittent running training. *Brazilian Journal of Biomotricity*. Vol. 2. Num 3. 2008a. p. 160-175.
- 3-Antunes Neto, J. M. F.; Pereira-da-Silva, L.; Macedo, D. Heat shock proteins as oxidative stress markers in rats submitted to exhaustive continuous running training. *Revista Brasileira de Educação Física, Esporte, Lazer e Dança*. Vol. 3. Num. 4. 2008b. p. 116-130.
- 4-Antunes Neto J. M. F.; Toyama, M. H.; Carneiro, E. M.; Boschero, A. C.; Pereira-da-Silva, L.; Macedo, D. V. Circulating leukocyte heat shock protein 70(hsp70) and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. *Stress*. Vol. 9. Num. 2. 2006. p. 107-115.
- 5-Bienz, M.; Pelham, H. R. B. Mechanims of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. *Advances in Genetics*. Vol. 24. 1987. p. 31-72.
- 6-Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. Vol. 72. 1976. p. 248-254.
- 7-Craig, E. A. The heat shock response. *Critical Reviews in Biochemistry*. Vol. 18. 1985. p. 239-280.
- 8-Craig, E. A. Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. *Science*. Vol. 260. Num. 5116. 1993. p. 1902-1904.
- 9-Didomenico, B. J.; Bugaisky, G. E.; Lindquist, S. The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell*. Vol. 31. Num. 3 (part 2). 1982. p. 593-603.
- 10-Ellis, R. J.; Van Der Vies, S. M. Molecular chaperones. *Annuals Reviews of Biochemistry*. Vol. 60. 1991. p. 321-347.
- 11-Essig, D. A.; Nosek, T. M. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? *Canadian Journal of Applied Physiology*. Vol. 22. Num. 5. 1997. p. 409-428.
- 12-Feige, U.; Polla, B. S. Heat shock proteins: the hsp70 family. *Experientia*. Vol. 50. Num. 11-12. 1994. p. 979-986.
- 13-Flaherty, K. M.; Deluca-Flaherty, C.; Mckay, D. B. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70Kda heat-shock cognate protein. *Nature*. Vol. 346. Num. 6285. 1990. p. 623-628.
- 14-Gerner, E. W.; Scheneider, M. J. Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature*. Vol. 256. Num. 500-502. 1975. p. 500-502.
- 15-Gething, M. J.; Sambrook, J. Protein folding in the cell. *Nature*. Vol. 355. Num. 6355. 1992. p. 33-45.
- 16-Hall, T. J. Role of hsp70 in cytokine production. *Experientia*. Vol. 50. Num. 11-12. 1994. p. 1048-1053.
- 17-Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press, 1989.

- 18-Hendrick, J. P.; Hartl, F. U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annuals Reviews of Biochemistry*. Vol.62. 1993. p. 349-384.
- 19-Laemli, U. K. Cleavage os structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Vol. 227. Num. 5259. 1970. p. 680-685.
- 20-Legendre, N.; Matsuidaira, P. Direct protein microsequence from imobilon-P transfer membrane. *Biotechniques*. Vol. 6. 1988. p. 1154-1159.
- 21-Li, G. C.; Meyer, J. L.; Mak, J. Y. Heat-induced protection of mice against thermal death. *Cancer Research*. Vol. 43. Num. 12 (part 1). 1983. p. 5758-5760.
- 22-Lindquist, S. The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry*. Vol. 55. 1986. p. 1151-1191.
- 23-Locke, M.; Noble, E. G.; Atkinson, B. G. Exercising mammals synthesize stress proteins. *American Journal of Physiology*. Vol. 258 (Cell Physiol. 27). 1990. p. C723-C729.
- 24-Morimoto, R. I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*. Vol. 259. Num. 5. 1993. p. 1409-1410.
- 25-Neupert, W.; Hartl, F. U.; Craig, E. A. How do polypeptides cross the mitochondrial membranes? *Cell*. Vol. 63. Num. 3. 1990. p. 447-450.
- 26-Rao, D. V.; Jones, G. L.; Watson, K. Comprehensive analysis of heat shock protein synthesis in human peripheral lymphocytes: the effect of penicillin/streptomycin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Vol. 31. Num. 8. 1999. p. 861-868.
- 27-Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia Basel*. Vol. 18. Num. 12. 1962. p. 571-573.
- 28-Ryan, A. J.; Gisolfi, C. G.; Moseley, P. L. Synthesis of 70K stress protein by human leukocytes: effect of exercise in the heat. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 70. Num. 1. 1991. p. 466-471.
- 29-Schlesinger, M. J. Heat shock proteins: the search for functions. *Journal Cell Biology*. Vol. 103. Num. 2. 1986. p. 321-325.
- 30-Smolka, M. B.; Zoppi, C. C.; Alves, A. A.; Silveira, L. R.; Marangoni, S.; Pereira-da-Silva, L.; Novelo, J. C.; Macedo, D. V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *American Journal of Physiology*. Vol. 279. Num 5. 2000. p. R1539-R1545.
- 31-Sorger, P. K. Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*. Vol. 65. 1991. p. 363-366.
- 32-Storti, R. V.; Scotti, M. P.; Rich, A. Translational control of protein synthesis in response to heat shock in *D. melanogaster* cells. *Cell*. Vol. 22. Num 3. 1980. p. 825-835,1980.
- 33-Stuart. R. A.; Cyr, D. M.; Neupert, W. Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. *Experientia*. Vol. 50. Num. 11-12. 1994. p. 1002-1011.
- 34-Terlecky, S. R. Hsp70s and lysosomal proteolysis. *Experientia*. Vol. 50. Num. 11-12. 1994. p. 1021-1025.
- 35-Vigh, L.; Maresca, B.; Harwood, J. L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends in Biochemical Sciences*. Vol. 23. Num. 10. 1998. p. 369-374.
- 36-Welch, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews*. Vol. 72. Num 4. 1992. p. 1063-1081.
- 37-Welch, W. J. How cells respond to stress. *Scientific American*. Vol. 268. Num 5. 1993. p. 34-41.
- 38-Yellon, D. M.; Marber, M. S. Hsp70 in myocardial ischaemia. *Experientia*. Vol. 50. Num. 11-12. 1994. p. 1075-1083.

Recebido para publicação 09/06/2012
Aceito em 21/06/2012