

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Expressão de HSP70 hipotalâmica induzida por exercício de natação de alta intensidade: importância da lactícemia e da ativação de receptores α -adrenérgicos

Rossana Rosa Porto

Orientadora: Denise Zancan

Co-orientador: Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Porto Alegre, abril de 2014

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
LISTA DE ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS E QUADROS	8
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Regulação do metabolismo energético pelo hipotálamo	14
1.2 Proteínas de choque térmico	19
1.2.1. HSP70 no Sistema Nervoso Central.....	22
1.2.2. Expressão de HSP70 em resposta ao exercício	25
2. OBJETIVOS	29
2.2. Objetivo Geral.....	29
2.3. Objetivos Específicos.....	29
3. MÉTODOS	30
3. 1 Animais	30
3.2 Protocolos de exercício	31
3.2.1 Exercício agudo.....	32
3.2.2 Treinamento	33
3.3 Dosagem de lactato e glicose	35
3.4 Western blot	36
3.5 Imunofluorescência	37
3.6. Captação de glicose e lactato radiomarcados	38
3.7 Captação de glicose e lactato <i>ex vivo</i>	40
3.8 Extração e dosagem de glicogênio	40
3.9 Injeção de L-lactato.....	41
3.10 Injeção de D-lactato	42
3.11 Bloqueadores adrenérgicos	42
3. 12 Análise estatística.....	43
4. RESULTADOS	44
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÃO	81
7. BIBLIOGRAFIA.....	83
8. ANEXO 1.....	97

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus **pais**, que sempre estiveram ao meu lado, me dando apoio e amor incondicional, que acreditaram em mim mesmo quando eu mesma duvidava, que sofreram e choraram comigo, que sempre me deram força para continuar acreditando nos meus sonhos, muitas vezes abrindo mão dos seus. Vocês me deram todas as oportunidades e ao mesmo tempo me ensinaram que a vida não é fácil, que é preciso correr atrás, pois bem, graças a vocês concluo mais essa etapa, com muito esforço e trabalho, e é a vocês que dedico essa dissertação, aos amores da minha vida! Obrigada por tudo e desculpem pela falta de tempo ou pelo mau humor corriqueiro.

Agradeço ao **Programa de Pós Graduação em Neurociências** da UFRGS por me dar a oportunidade de fazer o que eu mais amo, tenho muito orgulho de fazer parte deste PPG. Aos **professores**, que tanto admiro, pelas aulas incríveis que superaram qualquer expectativa e que me estimularam ainda mais a seguir o caminho da docência. Aos **funcionários**, por sempre estarem à disposição, sempre que precisei.

Obrigada ao meu relator, professor **Alberto Rasia**, por aceitar o convite e por ler esta dissertação com carinho e muita dedicação. Desde já agradeço aos outros membros da banca, professor **Luciano** e professora **Roselis**, por aceitarem o convite e o curto prazo.

Muito obrigada a minha orientadora **Denise Zancan** por toda a ajuda, és uma profissional e pessoa sensacional! Sempre que não sabia mais o que fazer corria pra ela, desesperada, e ela sempre disposta a ajudar, a qualquer momento, solucionando todos os meus problemas. Peço desculpas por toda a correria. Tu és um exemplo pra mim!!

Ao professor **Lino**, que sempre acreditou em mim e me trouxe para a pesquisa. Foi contigo que tudo começou, aos 16 anos, quando fiz a disciplina de biologia para educação física, um doido falando apaixonadamente sobre potenciais de membrana, desde então a neurociências virou meu mundo, minha paixão. Obrigada meu mestre, meu grande amigo!

Obrigada aos meus colegas **Ana, Bruna, Johanna, Marina** e **Fabício D.** por todos os momentos que passamos juntos, no desespero e correria desses dois anos, mas também na alegria e na diversão! Sempre pude contar com vocês a todo momento, e não foram poucas as

vezes que corri pedindo ajuda...Construímos conhecimento juntos, e além disso, grandes amizades! Vocês são de mais!!

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia Celular:

Aline e Sofia, sem vocês o laboratório nunca seria o mesmo, vocês me deram força em todos os momentos, mesmo de longe. Aprendi muito com cada uma, passamos momentos difíceis, mas o fato de superarmos juntas nos tornou melhores amigas! Obrigada por estarem sempre ao meu lado! Amo-as!

Ítalo, tu foi um herói por mais de 1 ano, em primeiro lugar por trabalhar com a minha carga horária, e em segundo, por me aguentar! Tu é uma pessoa fantástica, e tu sabes o quanto és especial pra mim, meu bebe. Obrigada por permanecer comigo até o fim e por toda a ajuda, sei que não foi fácil.

Leandro, Helena, Gabriela, Luís, Inês e Maciel, obrigada pela ajuda nos experimentos, principalmente tornando-os mais divertidos, vocês foram fundamentais para que eu concluísse essa dissertação.

Maurício e Patrícia, agradeço por serem os “melhores iniciações científica” que tive, brincadeiras à parte, obrigada pela ajuda de última hora, pelas dicas e pela disponibilidade de vocês, fico muito feliz de ter profissionais tão competentes ao meu lado.

Cinthia, obrigada por me acolher no laboratório, por sempre estar disposta a ajudar, mesmo que fosse pra nadar ratos. Obrigada por ser essa pessoa fantástica que és e que eu tanto admiro!

Ao **Thiago**, por falar na minha primeira semana de laboratório: “tu tem uma semana pra conseguir resultados para o SIC, pega esse hipotálamo aí e te vira!”. Obrigada por me direcionar para essa área, pela orientação e pela amizade.

Professor **Paulo Ivo**, agradeço por ter disponibilizado seu laboratório, por ter me aceitado no grupo, pela orientação e também pela amizade. Obrigada por todas as oportunidades, pois sem o senhor, não estaria fazendo o que mais amo. Agradeço também por me dar liberdade para poder criar meus próprios experimentos, por me fazer correr atrás das coisas, por poder absorver tanta coisa dessa sua mente brilhante, e por me ensinar que a humildade é a melhor qualidade de um bom pesquisador. Nesses 4 anos eu aprendi muito mais do que eu poderia imaginar e muito além de técnicas de laboratório.

A todos outros membros do laboratório, **Antônio, Bolivar, Joli, Maycon, Mirna, Victor** e ex membros, **Ana** e **Claudinha**, obrigada pela parceria, pela amizade, e pelas risadas. Todos vocês fazem parte deste grupo, e todos tem uma parcela de participação na conclusão deste trabalho, muito obrigada!

Não poderia deixar de agradecer ao meu outro grande amor, o que eu sigo desde pequena, o único responsável por me tirar do laboratório, por me colocar um sorriso e uma lágrima no rosto ao mesmo tempo, ao **Grêmio** Foot-Ball Porto Alegre, por todas as alegrias e amizades que me trouxeste. À torcida mais fanática do Brasil!!

Por fim, gostaria de me desculpar com meus familiares e amigos, pela falta de tempo e dedicação à vocês. Vocês são o que tenho de mais especial e valioso na vida!! Obrigada por tudo!

LISTA DE ABREVIATURAS

2-DG	2-Desóxi-glicose
AgRP	Peptídeo relacionado ao gene agouti
ATP	Trifosfato de adenosina
CAMKIV	Proteína cinase IV dependente de cálcio e calmodulina
CAMKII α	Proteína cinase II α dependente de cálcio e calmodulina
CART	Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
Csp	Proteína de sequência de cisteína
DNA	Ácido desóxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra-acético
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
GE	Excitado pela glicose (Glucose excited)
GI	Inibido pela glicose (Glucose inhibited)
GLUT1	Transportador de Glicose-1
GLUT4	Transportador de Glicose-4
GSK3 β	Glicogênio sintase cinase β
HSE	Elemento Regulador de Choque Térmico (Heat Shock Element)
HSF	Fator de Choque Térmico (Heat Shock Factor)
HSPs	Proteínas de Choque Térmico (Heat Shock Protein)
HSR	Resposta ao choque térmico (Heat Shock Response)
HSP40	Proteína de choque térmico de 40 kDa
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
HSP72	Proteína de choque térmico de 72 kDa
HSP73	Proteína de choque térmico de 73 kDa
HSP90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
IRS1	Substrato do Receptor De Insulina 1
IRS2	Substrato do Receptor De Insulina 2
JNK	c-Jun NH(2)-terminal cinase

K _{ATP}	Canais de potássio sensíveis a ATP
LHA	Área lateral do hipotálamo
LTP	Potenciação de longa duração (Long term potentiation)
MCT1	Transportador de monocarboxilato 1
MCT2	Transportador de monocarboxilato 2
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do trato solitário
PBS.....	Tampão Salina tamponada com fosfato
PFA	Área perifornical
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
POMC	Proopiomelanocortina
PKB	Proteína cinase B
PKC	Proteína cinase C
PMSF	Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila
PVN	Núcleo paraventricular
Rep	Repouso
RNS	Espécies reativas de nitrogênio (Reactive nitrogen species)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (Reactive oxygen species)
VO ₂ máx	Volume máximo de oxigênio

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Fig 1. Figura demonstrativa do metabolismo energético.	15
Figura 2. Esquema de como alguns estímulos fisiológicos estimulam a síntese de HSP70.....	21
Fig. 3. Avaliação da temperatura retal em animais submetidos ao exercício de natação.....	31
Fig. 4. Imagens demonstrativas do protocolo de exercício.	33
Tabela 1 - Progressão do treinamento.	34
Fig. 5. Organização dos grupos experimentais.....	35
Quadro 1. Esquema experimental realizado para análise da expressão de HSP70 no hipotálamo..	44
Fig. 6. Imunodeteccção de HSP70 no hipotálamo de ratos imediatamente após sessão aguda de exercício de diferentes intensidades..	45
Fig.7. Imunodeteccção de HSP70 no hipotálamo de ratos 2h após sessão aguda de exercício de diferentes intensidades.....	45
Fig. 8. Imunodeteccção de HSP70 no hipotálamo de ratos 6 h após sessão aguda de exercício de diferentes intensidades.....	46
Fig. 9. Imunodeteccção de HSP70 no hipotálamo de ratos 12h após sessão aguda de exercício de diferentes intensidades.....	47
Fig. 10. Correlação entre a imunodeteccção de HSP70 no hipotálamo de ratos e a intensidade de exercício 12 h após sessão aguda de exercício de diferentes intensidades.....	47
Fig. 11. Imunodeteccção de HSP70 no hipotálamo de ratos 72h após sessão aguda de exercício de diferentes intensidades.....	48
Fig. 12. Imunodeteccção de HSP70 no hipotálamo de ratos treinados durante 8 semanas.....	49
Fig. 13. Correlação entre a imunodeteccção de HSP70 no hipotálamo de ratos e intensidade de exercício no grupo crônico 72 h após a última sessão de exercício de diferentes intensidades.	50
Fig. 14. Localização da HSP70 no hipotálamo.	51
Fig 15. Valores de glicemia imediatamente (0 h), 12 h e 72 h após uma sessão de exercício.	53
Fig. 16. Valores de laticemia imediatamente (0 h), 12 h e 72 h após uma sessão de exercício	53
Fig. 17. Correlação entre a média das concentrações de laticemia encontradas imediatamente após uma sessão de exercício nas diferentes intensidades e a expressão de HSP70 12 h após a sessão de exercício agudo.....	54
Quadro 2. Esquema experimental do protocolo realizado para verificar a expressão de HSP70 após injeção de L-lactato..	55
Fig. 18. A. Imunodeteccção de HSP70 no hipotálamo de ratos 12h após injeção intraperitoneal de L-lactato em diferentes concentrações.....	56

Quadro 3. Desenho experimental do protocolo realizado para da expressão de HSP70 após injeção de D-lactato 10 minutos antes da realização da sessão de exercício..	57
Fig. 19. Valores de glicemia e laticemia imediatamente após a sessão de exercício agudo, em diferentes intensidades, nos grupos que não receberam nenhuma injeção e nos que receberam D-lactato intravenoso.....	58
Fig. 20. Imunodeteção de HSP70 no hipotálamo 12 h após sessão aguda de exercício em diferentes intensidades, em animais que foram injetados com D-lactato intravenoso 10 minutos antes do início da sessão, em diferentes concentrações.....	59
Fig. 21. Conteúdo de glicogênio no hipotálamo de ratos sedentários imediatamente, 12 h e 72 h após a sessão de exercício.	60
Quadro 4. Desenho experimental do protocolo realizado para análise do conteúdo de glicogênio..	60
Quadro 5. Esquema experimental do protocolo realizado para captação de glicose.....	61
Fig. 22. Captação de [³ H]2-desóxi glicose pelo hipotálamo de ratos sedentários imediatamente, 12 h e 72 h após uma sessão de exercício e de ratos submetidos ao treinamento, 72 h após a última sessão de exercício	62
Fig. 23. Captação de [¹⁴ C]lactato pelo hipotálamo, fígado e coração de ratos sedentários imediatamente após uma sessão de exercício.....	63
Quadro 6. Esquema experimental do protocolo realizado para captação de lactato..	63
Quadro 7. Esquema experimental do protocolo realizado para captação de glicose e lactato <i>ex-vivo</i> ..	64
Fig. 24. Captação de [³ H]2-desóxi glicose pelo hipotálamo extraído de ratos sedentários imediatamente após uma sessão de exercício e incubados por 90 min com diferentes concentrações de L-lactato	65
Fig. 25. Captação de [¹⁴ C] lactato pelo hipotálamo extraído de ratos sedentários imediatamente após uma sessão de exercício e incubados por 90 minutos com diferentes concentrações de L-lactato	65
Quadro 8. Esquema experimental do protocolo realizado para expressão de HSP70 após injeção de bloqueadores adrenérgicos.	66
Fig. 26. Glicemia 12 h após uma sessão aguda de exercício de diferentes intensidades, onde os animais receberam injeção intraperitoneal de bloqueadores adrenérgicos 30 minutos antes do início da sessão.	67
Fig. 27. Lacticemia 12 h após uma sessão aguda de exercício de diferentes intensidades, onde os animais receberam injeção intraperitoneal de bloqueadores adrenérgicos 30 minutos antes do início da sessão.	67
Fig. 28. Imunodeteção de HSP70 12 h após uma sessão aguda de exercício de diferentes intensidades, onde os animais receberam injeção intraperitoneal de bloqueadores adrenérgicos 30 minutos antes do início da sessão.	68

Fig. 29. Figura representativa dos resultados encontrados e dos possíveis mecanismos de regulação.....79

RESUMO

Os neurônios são células extremamente sensíveis a qualquer tipo de estresse, dentre eles, alterações metabólicas, estresse oxidativo e ativação da via inflamatória e apoptótica, fatores que estão presentes no hipotálamo nos estágios iniciais de doenças metabólicas como a obesidade e diabetes do tipo II. Como o exercício físico causa uma série de alterações fisiológicas que são capazes de elevar os níveis de HSP70, uma chaperona molecular, que tem funções citoprotetoras e atua sobre todos os parâmetros citados acima, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do exercício agudo e do treinamento físico realizado em diferentes intensidades sobre a expressão de HSP70 e o metabolismo energético do hipotálamo. Para tanto, ratos Wistar machos foram submetidos a um protocolo de exercício (natação) agudo ou treinamento em diferentes intensidades, por 20 minutos, estando os animais divididos nos grupos 4% (moderado), e 8% (intenso) do seu peso corporal atado à cauda, e o grupo controle, que permanecia em água rasa, chamado repouso. Os resultados mostraram que somente o exercício de alta intensidade foi capaz de elevar os níveis de HSP70 (por Western Blot) 12 h após o final da sessão aguda de exercício, num processo relacionado à elevação da lactemia, pois a administração de D-lactato (que interfere na produção e captação de L-lactato endógeno) antes do exercício foi capaz de bloquear as alterações apresentadas pelo grupo que se exercitou em alta intensidade. Entretanto, a lactemia não foi o único responsável, pois a administração sistêmica de L-lactato exógeno em diferentes concentrações (0, 3, 5, 10 e 20 mmol/L) não foi capaz de mimetizar os efeitos do exercício sobre a expressão de HSP70 no hipotálamo. Foi realizado também o bloqueio de receptores α adrenérgicos antes do exercício (prazosina, bloqueador do receptor α_1 ; ioimbina, bloqueador do receptor α_2 ; prazosina com ioimbina para bloquear ambos) para verificar a participação desta via na expressão de HSP70 induzida pelo exercício, o que acabou abolindo a diferença no grupo de maior intensidade, e até reduzindo a valores mais baixos que o repouso quando bloqueado o receptor α_1 . O exercício de alta intensidade também causou alterações no metabolismo energético hipotalâmico, reduzindo a captação de glicose pelo hipotálamo por até 12 h, elevando a captação de lactato logo após o final da sessão, e mantendo os níveis de glicogênio mais elevados do que os do repouso e 4%, preservando assim sua reserva energética. O treinamento de alta intensidade por 8 semanas elevou os níveis basais de HSP70 no hipotálamo e reduziu a captação de glicose mesmo em repouso, sugerindo uma resposta adaptativa deste tecido ao exercício intenso realizado cronicamente. Com estes resultados, concluímos que o aumento na

expressão de HSP70 induzido por exercício de alta intensidade é dependente de alterações na laticemia e da ativação de receptores α -adrenérgicos.

ABSTRACT

Neurons are extremely sensitive to any type of stress, including metabolic disturbances, oxidative stress and activation of inflammatory and apoptotic pathway, facts that are present in the early stages of metabolic diseases such as obesity and type II diabetes. Since exercise cause a serious physiological changes capable of raising the levels of HSP70, a molecular chaperone that has cytoprotective functions, and act in all parameters mentioned above, the aim of this study was to evaluate the effect of acute exercise and physical training conducted at different intensities in the expression of HSP70 and the energy metabolism of the hypothalamus. For this purpose, male Wistar rats underwent a protocol of swimming exercise and training at different intensities, for 20 minutes, divided into groups 4% (moderate) and 8% (intense) of their weight attached to the tail, and the control group, that stood in shallow water, called “rest”. The results showed that only the high-intensity exercise was able to increase levels of HSP70 12 h after the session, a process related to lacticemia, since the administration of D-lactate before the exercise (which interferes in the production and uptake of endogenous L-lactate) was able to block the changes presented by the group that exercised at high-intensity. However, lacticemia was not the solely responsible, because the exogenous L-lactate injected at different concentrations (0, 3, 5, 10 e 20 mmol/L) was unable to mimic the effects on the expression of HSP70 in the hypothalamus. Blocking α -adrenergic receptors before exercise was conducted (prazosin, α 1 receptor blocker; Yoimbin, α 2 receptor bloker; prazosin with Yoimbin to block both) to verify the role of this pathway in the expression of HSP70 induced by exercise, which eventually abolished the difference presented in the high-intensity group, even reducing to lower values then the “rest” group when α 1 receptor was blocked. The high-intensity exercise also caused changes in the hypothalamic energy metabolism, reducing glucose uptake by the hypothalamus for up to 12 h, increasing the lactate uptake immediately after the end of the session, and maintaining the higher level of glycogen content when compared to the “rest” and 4% group, thus preserving its energy reserve. High-intensity training for 8 weeks increased basal levels of HSP70 in the hypothalamus and reduced glucose uptake at rest, showing an adaptive response of this tissue to the intense exercise performed chronically.

1. INTRODUÇÃO

A supernutrição e o estilo de vida sedentário estão entre os principais fatores que levam a um aumento na prevalência de obesidade e diabetes do tipo II, doenças que hoje alcançam níveis epidêmicos nos seres humanos. Nos mamíferos, a ingestão alimentar e o gasto energético são regulados por neurônios específicos localizados no hipotálamo¹, que processam mudanças agudas de diversos hormônios e nutrientes, e disparam respostas metabólicas e comportamentais para controlar a homeostase energética. Prejuízos nessas vias de sinalização são suficientes para promoverem hiperfagia, obesidade e diabetes do tipo II (Ropelle *et al.*, 2010), o que acompanha uma falha nos mecanismos de citoproteção, como redução dos níveis intracelulares de chaperonas moleculares (Hooper e Hooper, 2005), tornando estas um grande alvo farmacológico e não farmacológico (induzida de forma endógena) para o tratamento e mesmo prevenção de doenças metabólicas.

1.1 Regulação do metabolismo energético pelo hipotálamo

A regulação do balanço energético é muito mais do que simplesmente regulação da glicose plasmática. O balanço energético envolve a ingestão alimentar, o armazenamento e utilização de energia, que estão sob regulação do sistema nervoso simpático e parassimpático (Routh, 2002). Dentre as regiões hipotalâmicas que participam deste controle energético, destaca-se o núcleo arqueado, que possui neurônios de projeção divididos em dois grupos, nomeados de acordo com os peptídeos que liberam. O primeiro grupo libera peptídeos anorexígenos, chamados proopiomelanocortina (POMC) e transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), e o segundo libera os orexígenos neurpoeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP). Dentre os hormônios capazes de atuar como sinalizadores nesses neurônios estão a leptina e insulina, que atuam estimulando os neurônios POMC/CART e inibindo os NPY/AgRP, ocasionando, conseqüentemente, a sensação de saciedade, e a grelina, que tem efeito contrário, estimulando os neurônios NPY/AgRP e inibindo os POMC/CART, aumentando a fome e facilitando o comportamento de busca por alimento (Elmquist *et al.*, 2005; Mountjoy e Rutter, 2006; Lam *et al.* 2009; Morton e

¹ É importante salientar que o hipotálamo não pode ser considerado uma unidade anatômica ou funcional, pois possui diversos núcleos e subdivisões, que desempenham inúmeras funções. Por razões metodológicas, neste trabalho o hipotálamo será referido como um todo.

Schwartz, 2011). Ambos fazem conexões com outros núcleos do hipotálamo, que exercem efeito sobre o núcleo do trato solitário (Fig.1), onde essas informações são integradas juntamente com as outras que vem da periferia, por vias aferentes, regulando a ingestão alimentar (Schwartz *et al.*, 2000; Morton *et al.*, 2006).

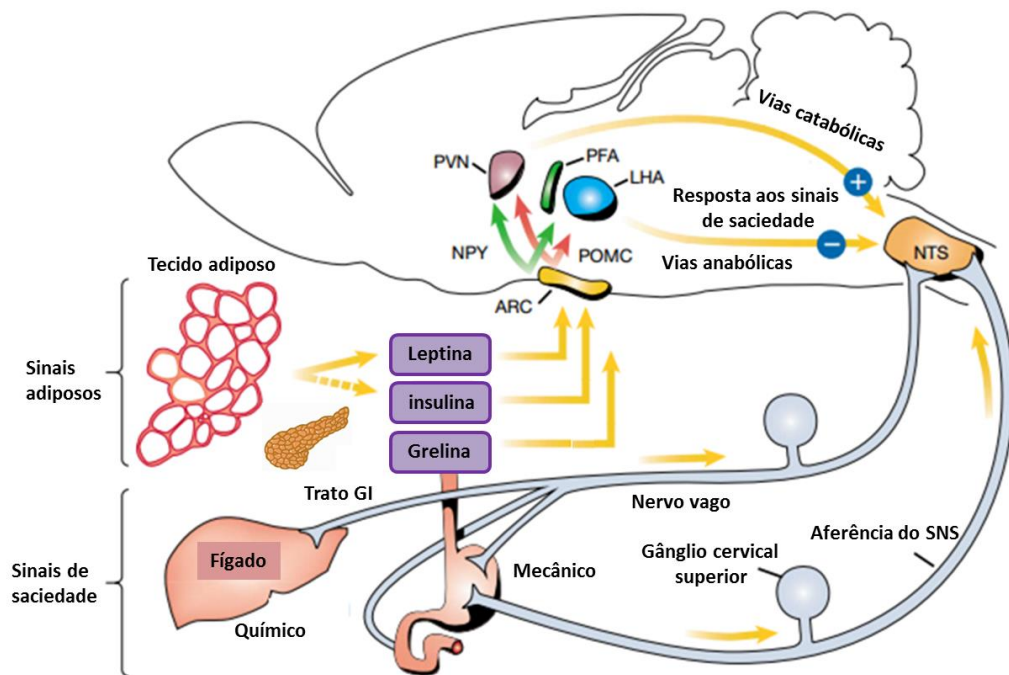


Fig 1. Figura demonstrativa do metabolismo energético. A leptina e a insulina estimulam vias catabólicas, estimulando os neurônios POMC/CART e inibindo a via anabólica dos neurônios NPY/AgR, ambos originados no núcleo arqueado do hipotálamo. A grelina tem efeito contrário sobre essas vias. As vias provenientes do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) se projetam para a área lateral do hipotálamo (LHA) e núcleo paraventricular (PVN), onde fazem conexões com vias centrais simpáticas e parassimpáticas que se projetam para áreas do tronco encefálico responsáveis por processar sinais de saciedade. Aferências advindas do trato gastrointestinal transmitem informações de saciedade pelo nervo vago e fibras simpáticas para o núcleo do trato solitário (NTS), que são integradas às informações advindas do hipotálamo, regulando assim a ingestão alimentar. PVN, núcleo paraventricular; DMN, núcleo dorsomedial; VMN, núcleo ventromedial; LHA, área lateral hipotalâmica; DHA, núcleo dorsal; PFA, área perifornical, ARC, núcleo arqueado, NTS, núcleo do trato solitário. (figura modificada de Schwartz *et al.*, 2000).

O encéfalo desenvolveu mecanismos para sentir e responder a mudanças nos níveis de nutrientes. Sensores de glicose centrais e periféricos podem servir para informar ao encéfalo que os níveis de glicose sanguínea estão caindo a níveis perigosos (Routh, 2002). Existem neurônios em alguns núcleos do hipotálamo e também do tronco encefálico que mudam sua frequência de disparo de potenciais de ação em resposta à mudanças na glicose extracelular e plasmática (Anand *et al.*, 1964; Oomura *et al.*, 1964, Shimizu *et al.*, 1983), estes podem ser

excitados (GE) ou inibidos (GI) pelos níveis elevados desta molécula (Burdakov *et al.*, 2005). O mecanismo de disparo dos neurônios GE em resposta a elevações de glicose é muito semelhante ao das células β pancreáticas, via canais de potássio sensíveis ao trifosfato de adenosina (K_{ATP}) (Mountjoy e Rutter, 2006). Quando há grande disponibilidade de glicose na célula, há um aumento na concentração de ATP, o que resulta em fechamento dos canais K_{ATP} nestes neurônios, causando despolarização dos mesmos e liberação de neurotransmissor, reduzindo a glicemia, pela redução na produção de glicose pelo fígado, via nervo vago (Lam *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2009). Ao contrário, quando os níveis de glicose estão baixos, o canal permanece aberto, hiperpolarizando a célula. Já nos neurônios GI, com o aumento na concentração de glicose extracelular, há uma diminuição na frequência de potenciais de ação, pela abertura de canais de Cl^- sensíveis à ATP. Quando os níveis de ATP são reduzidos nestes neurônios, os canais de Cl^- fecham e ocorre despolarização destas células. Os neurotransmissores candidatos liberados nos neurônios GE e GI são POMC/CART e NPY/AgRP, respectivamente (Mountjoy e Rutter, 2006). A atividade dessas células é crítica no sentido de responder rapidamente a mudanças no status energético corporal, garantindo neuroproteção contra excitotoxicidade glutamatérgica causada por situações de severa depleção de ATP, e também pela necessidade de garantir que o metabolismo periférico e a produção de glicose sejam suficientes para as necessidades do encéfalo, envolvendo integração entre informações sobre níveis de glicose extracelular local, dos sensores de glicose na periferia e sobre o status metabólico geral, a fim de gerar uma regulação coordenada da homeostase da glicose para garantir que o encéfalo receba suprimento adequado, já que ao contrário de outros tecidos periféricos, o sistema nervoso central sofre danos irreversíveis quando privado de glicose por alguns minutos (Routh, 2002; Burdakov *et al.*, 2005). Um fator importante a ser ressaltado é que estes neurônios não são responsivos apenas à glicose, mas mudanças nos níveis de lactato mimetizam esses efeitos. Injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de L-lactato (5 mM) é capaz de reduzir os níveis de glicemia por diminuição da produção de glicose hepática e expressão gênica da glicose-6-fosfatase. Este efeito é consequência da utilização do lactato pelo encéfalo, pois o bloqueio da enzima lactato desidrogenase (LDH) por infusão de oxamato (i.c.v.) aboliu os efeitos da infusão de L-lactato sobre a glicemia e produção de glicose. O bloqueio do metabolismo do lactato no hipotálamo resulta em uma perda de 40% da ação inibitória da glicose circulante sobre a produção de glicose, mostrando a importância da glicose à lactato nos astrócitos e do lactato à piruvato nos neurônios para a regulação da homeostase da glicose (Lam *et al.*, 2005). O bloqueio da produção de glicose pelo fígado por elevação na glicemia é prejudicado na

diabetes do tipo II (Matschinsky *et al.*, 2006), porém o lactato (i.c.v.) é capaz de reduzir a produção de glicose em roedores com diabetes descontrolada, roedores com hipoinsulinemia e roedores com resistência à insulina induzida por dieta, mostrando que seu efeito não é dependente da sinalização da insulina, pois reduz os níveis de glicose mesmo em situações de resistência à insulina (Chari *et al.*, 2008).

O sistema nervoso requer energia utilizando três tipos de componentes de redirecionamento energético (Peters *et al.*, 2007): o primeiro é o alocativo, que redireciona o fluxo energético do organismo para o encéfalo. Primeiramente os astrócitos suprem a demanda energética dos neurônios com suas reservas de glicogênio, que é transformado em lactato e então transportando para os neurônios, onde é oxidado (Pellerin *et al.*, 2007). Posteriormente, o sistema nervoso busca energia de tecidos periféricos, como o músculo esquelético, que em repouso necessita de insulina para a captação de glicose via transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), ao contrário do encéfalo que possui o transportador de glicose tipo 1 (GLUT1) e não depende de insulina (Pellerin e Magistretti, 2011). Dessa forma, quando for necessário, o encéfalo envia sinalização simpática via receptor $\alpha 2$ ao pâncreas endócrino, para que este reduza a produção e liberação de insulina (Chan *et al.*, 1991; Chapman *et al.*, 1999; Fruehwald-Shultes *et al.*, 2000), controlando assim a quantidade de glicose que é transportada através da barreira hematoencefálica e a que é captada pela musculatura esquelética. Quando o músculo esquelético está em atividade, ele é capaz de captar glicose na ausência da insulina (Shepherd e Kahn, 1999; Zorgano *et al.*, 2002), produzindo e liberando lactato na corrente sanguínea, de maneira dependente da intensidade e duração do exercício. Parte do lactato é reciclada no fígado para manter a disponibilidade de glicose. Com o aumento da intensidade do exercício e da demanda energética encefálica, o encéfalo deve desencadear o aumento da atividade simpática que, por sua vez, estimula a produção de lactato pelo músculo esquelético (Parolin *et al.*, 1999), que em parte é utilizado pelas próprias células musculares (Brooks, 2002), mas em excesso é transferido para o plasma e eritrócitos (Gladden, 2004). O aumento de lactato circulante sistêmico atinge a circulação encefálica em concentrações consideráveis, podendo ser absorvidos via transportador de monocarboxilato 1 (MCT1) e captado pelos neurônios via transportador de monocarboxilato 2 (MCT2) para oxidação (Peters *et al.* 2007).

O segundo componente é o ingestivo (Peters *et al.* 2007), que se inicia ao vermos ou sentirmos o cheiro de algum alimento, cessando o comportamento alocativo, aumentando o tônus parassimpático, levando as células β a produzirem insulina. Sensores de glicose na veia portal do fígado medem a quantidade de nutrientes e mandam aferências para os centros

hipotalâmicos, que suprimem a atividade simpática, aumentando ainda mais o tônus parassimpático e a liberação de insulina (Fujita e Donovan, 2005). Como resultado disto, temos grande captação de glicose pelo músculo e tecido adiposo, via GLUT4, que então é armazenada em forma de glicogênio e triglicerídeos (Peters *et al.*, 2007).

O terceiro componente é o comportamento exploratório, que inicia quando o encéfalo precisa de energia e não consegue obter prontamente (Peters *et al.* 2007). O comportamento exploratório é desencadeado pelo estado metabólico do encéfalo ou pode ser iniciado antecipadamente (aprendizagem), pois há também um gasto energético na busca pelo alimento, principalmente para a musculatura em atividade (Giacca *et al.*, 2005), não garantindo o suprimento do sistema nervoso central. Para evitar a falta de energia, o encéfalo coordena simultaneamente o comportamento alocativo com o início do movimento exploratório por meio da ativação do sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA), aumentando ainda mais a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) para garantir lactato para as células nervosas até que seja encontrado alimento (Kempainen *et al.*, 2005).

A longo prazo, um encéfalo que falha em satisfazer suas necessidades através do componente alocativo, aumentando o ingestivo, pode ter como consequência um aumento da massa corporal. Além disso, com esta falha na alocação de energia, há também uma redução no comportamento exploratório e a atividade física é reduzida. Para manter então seus níveis energéticos normais, o encéfalo manda comando para que a ingestão seja maior, já que este não está conseguindo redirecionar a energia corporal. Um exemplo disto é a hiperinsulinemia com níveis normais de glicose, caso que antecede doenças metabólicas e marca o aumento de peso, o que fará com que a glicose seja direcionada para os tecidos periféricos, músculo esquelético e tecido adiposo (Swinburn *et al.*, 1991; Odeleye *et al.*, 1997; Sigal *et al.*, 1997). Neste caso, uma dieta hipocalórica não seria benéfica, pois reduziria ainda mais os nutrientes disponíveis para o sistema nervoso central, fazendo com que este aumente os sinais para aumento da ingestão alimentar. Segundo a teoria do “encéfalo egoísta”, essa seria a principal causa da hiperfagia e conseqüentemente, da obesidade (Peters *et al.*, 2004).

Como consequência do aumento do consumo de dieta rica em gorduras, diversos distúrbios hipotalâmicos são descritos, como o aumento do estresse oxidativo e de atividade de vias inflamatórias e apoptóticas nesta região (Meng e Cai, 2011). Ratos que foram alimentados por 16 semanas com uma dieta contendo 45% de gordura tiveram elevação de

diversas citocinas pró-inflamatórias, o que culminou na ativação da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e da c-Jun NH(2)-terminal cinase (JNK), que aumentaram a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 e 2 (IRS1 e IRS2) no aminoácido serina, causando resistência à insulina (Souza *et al.*, 2005). Em outro estudo, os animais receberam dieta contendo 60% de gordura, e eles (Thaler *et al.*, 2012) verificaram aumentos nos níveis de mRNA de citocinas pró-inflamatórias no hipotálamo em apenas 3 dias, com redução do mRNA em 7, e retorno a níveis elevados em 28 dias, o que chamaram de padrão “on-and-off”. Verificaram também que nos primeiros dias, o hipotálamo era capaz de responder com estímulos protetores, como aumento da astrogliose e de HSP72, mas com a manutenção da exposição à dieta hiperlipídica, o distúrbio do núcleo arqueado e da eminência mediana eram reestabelecidos. Essa resposta inflamatória também ativa uma sequência de eventos apoptóticos, que resulta na morte de neurônios da POMC em até 25% (Moraes *et al.*, 2009).

1.2 Proteínas de choque térmico

Proteínas de choque térmico (do inglês, *heat shock proteins*, HSP) são proteínas muito conservadas durante a evolução das espécies, encontradas em organismos eucarióticos e procarióticos. Foram descobertas em 1962, por surgimento de um novo padrão de espessamento cromossomal em células de glândulas salivares de *Drosophila busckii* quando expostas acidentalmente a altas temperaturas (Ritossa, 1962).

Diversos outros estímulos estressores são capazes de induzir a expressão destas proteínas (Fig.2), como radiação ultravioleta, metais pesados (cádmio, mercúrio, cobre e zinco), arsenito de sódio (Levinson *et al.*, 1990), análogos de aminoácidos (Kelley e Schlesinger, 1978), infecção microbial, inflamação, isquemia, óxido nítrico, estresse oxidativo, hormônios, antibióticos, estimuladores da proteína cinase C (PKC) (Ding *et al.*, 1978), além de agentes fisiológicos como fatores de crescimento, diferenciação e divisão celular (Kiang e Tsokos, 1998). As HSPs respondem a estressores e situações clínicas que causam distúrbio na forma terciária das proteínas e efeitos adversos no metabolismo, como hipoglicemia e hiperglicemia (De Maio, 1999).

As HSP podem ser divididas em famílias, de acordo com suas massas moleculares (HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e HSP30). A família mais conservada e estudada é a com peso molecular de aproximadamente 70 kDa (HSP70), que é dividida em duas

formas: a constitutiva de 73 kDa (HSC70 ou HSP73) e a induzível de 72 kDa (HSP70 ou HSP72). A forma constitutiva é sintetizada na maioria das células e é induzível somente de maneira moderada, pois é constitutivamente expressa em condições basais (Asea, 2005). Por outro lado, a forma induzível está presente em menores quantidades nas células, mas pode ser rapidamente sintetizada (Kiang e Tsokos, 1998).

A regulação da resposta ao estresse é mediada por um ativador transcricional, o fator de choque térmico (HSF), que liga-se ao seu elemento regulador de choque térmico (HSE) presente em todos os genes promotores. Em condições normais, o HSF está presente na célula na forma de monômero, e se liga ao DNA com baixa afinidade. Entretanto, em condições estressantes, o HSF é convertido de forma reversível ao estado trimérico, e adquire alta afinidade pelo DNA, se ligando no HSE presente nos promotores dos genes responsivos ao estresse, aumentando, deste modo, a expressão gênica da proteína de choque térmico (Fig.2). Sua atividade é reprimida pela interação com HSP90, HSP70 e HSP40 (retroalimentação negativa), assim como pela sua fosforilação nos resíduos Ser303 e Ser307, e também por acetilação da lis80 no domínio de ligação ao DNA (Orosz e Benjamin, 2007; Akerfelt *et al.*, 2010).

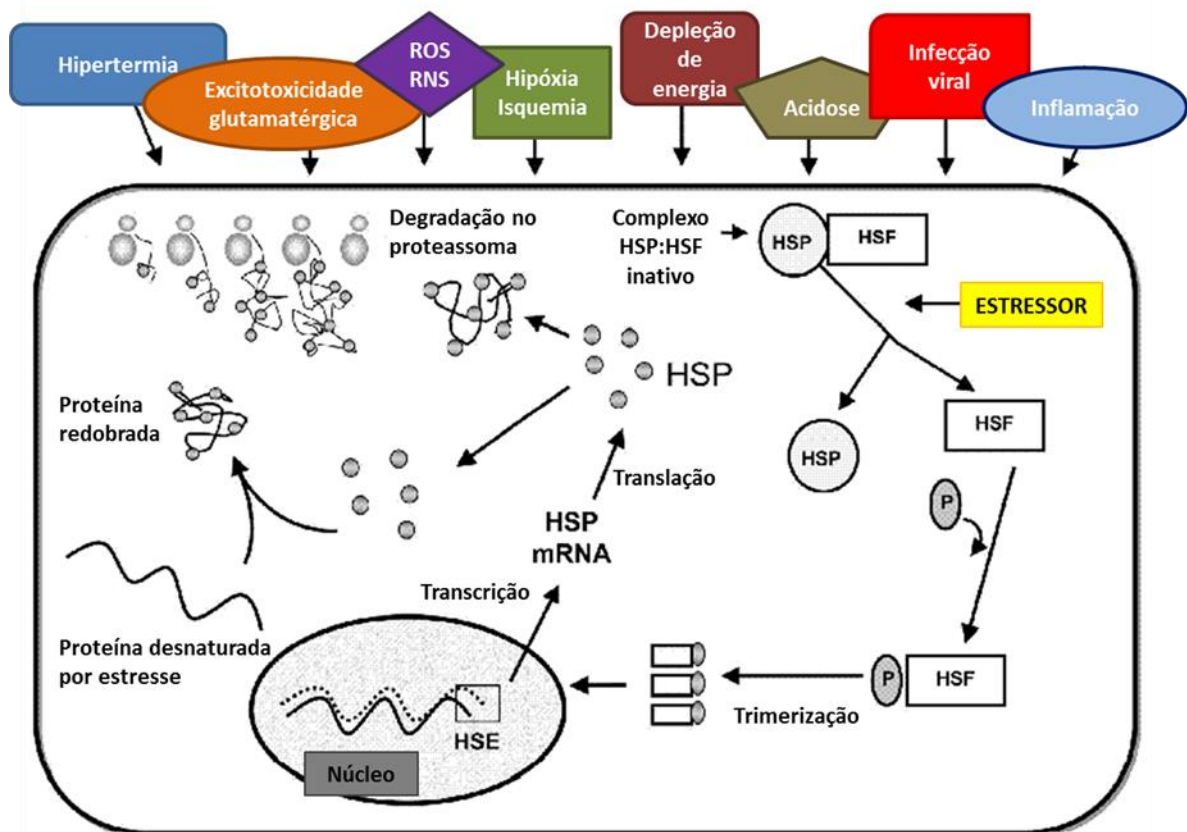


Figura 2. Esquema de como alguns estímulos fisiológicos estimulam a síntese de proteína de choque térmico de 70kDa (HSP70). Em estado de repouso, o Fator de choque térmico 1 (HSF1) é um monômero no citoplasma e no núcleo, sendo uma fosfoproteína mesmo em situações não estressantes que interage com a proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90), HSP70 e proteína de choque térmico de 40 kDa (HSP40), ficando inativo. Durante o estímulo estressor, o HSF1 se dissocia do complexo das proteínas de choque térmico (HSPs), permitindo que este seja trimerizado e se ligue aos elementos responsivos ao estresse (HSE) nos genes da HSP70, aumentando seu mRNA e expressão protéica. Dentre as principais funções da HSP70, se destaca a sua atuação como chaperona molecular, acompanhando as proteínas mutantes ou dobradas incorretamente para serem degradadas, além de auxiliar no redobramento de proteínas que foram desnaturadas em função do estresse. ROS, espécie reativa de oxigênio; RNS, espécie reativa de nitrogênio; P, fosfato.

A HSP73 reconhece e se liga a resíduos hidrofóbicos expostos de proteínas deformadas ou desnaturadas, que são acompanhadas para ubiquitinação, e posteriormente direcionadas ao proteassoma para degradação. A HSP73 também participa da autofagia mediada por chaperonas e regula função de receptores esteróides (Akerfelt *et al.*, 2010). A HSP70 é induzida em situações de estresse, prevenindo agregação e mutação de proteínas, além de ter efeito citoprotetor por ser antiinflamatória (principalmente por bloquear o fator de transcrição NF- κ B e a via da JNK), anti-apoptótica (reduzindo liberação de citocromo-c) e

defender o organismo contra o estresse oxidativo e privação de glicose e de oxigênio (Lee *et al.*, 2001; Matsumori *et al.*, 2006; Buzzard *et al.*, 1998, Bellmann *et al.*, 1996).

A HSP72 é associada ao fenômeno de tolerância pois quando uma célula é exposta a um insulto subletal, que causa um aumento na expressão desta proteína, um posterior insulto mais severo não causa tantos danos, pois está protegido pela superexpressão de HSP72 (Lee *et al.*, 2001). Estruturas (microfilamentos e centrossomos) e processos (transcrição e translação) são estabilizados ou reparados durante o segundo estresse nas células tolerantes (De Maio, 1999).

Dentre algumas doenças que vêm sendo relacionadas com defeitos na expressão da HSP70, está a resistência à insulina, uma importante condição fisiopatológica desencadeada por um processo inflamatório crônico, principalmente em pacientes obesos. Estudos baseados em biópsia de músculo esquelético de pacientes diabéticos mostram que o nível de expressão de mRNA de HSP72 está reduzido quando comparado com indivíduos saudáveis, o que está correlacionado com o grau de resistência à insulina (Kurucz *et al.*, 2002). Ao contrário, a superexpressão de HSP72 no músculo ou no camundongo inteiro foi capaz de proteger contra hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e resistência insulínica causada por dieta ou obesidade e que esta proteção parece estar fortemente associada ao efeito inibidor da HSP70 sobre a ativação da JNK, inibindo a fosforilação do IRS-1 e 2 em serina e diminuindo a resistência à insulina (Chung *et al.*, 2008; Gupte *et al.*, 2009).

1.2.1. HSP70 no Sistema Nervoso Central

Dentre as funções da HSP70 no sistema nervoso central (SNC), pode-se ressaltar que elas reconhecem e se vinculam a cadeias polipeptídicas nascentes para intermediar proteínas dobradas, prevenindo sua agregação e desdobraimento, participam da montagem e dobramento de proteínas nascentes, promovem translocação de proteínas através da membrana intracelular e estão envolvidas na vida e morte celular (Landsberg, 2006). A HSP70 pode estar presente na sinapse (Ohtsuka e Suzuki, 2000), modulando a atividade de canais de cálcio pré-sinápticos juntamente com proteínas de sequência de cisteína (csp). Também pode estar envolvida com a plasticidade sináptica quando presente na porção pós-sináptica, pois a HSP73 pode ser induzida pela ativação sináptica (Kaneko *et al.*, 1993) e acredita-se que esta está envolvida nos mecanismos que induzem receptores AMPA funcionais em sinapses silenciosas durante a

indução da potenciação de longa duração (LTP) [Song *et al.*, 1998]. Essa localização pós-sináptica de HSP73 parece ser fundamental para a transmissão sináptica e sua regulação mesmo na ausência de estímulo nocivo, principalmente por seu papel na síntese proteica local, se ligando a polipeptídeos nascentes (Frydman *et al.*, 1994) e permitindo a formação correta de novas proteínas, fator essencial para a manutenção da plasticidade sináptica já expressa, tal como LTP e o processo de consolidação da memória (Rao e Steward, 1991; Tiedge e Brosius, 1996).

Células individuais no encéfalo mostram diferentes suscetibilidades a situações de estresse, podendo ou não expressar proteínas de choque térmico, o que depende também do tamanho celular (Morrison *et al.*, 1994). Células pós-mitóticas, como os neurônios, são particularmente vulneráveis ao efeito prejudicial de proteínas desdobradas e/ou agregadas porque não podem diluir moléculas potencialmente tóxicas através da divisão celular. O acúmulo de proteínas desdobradas nos neurônios e em outras células acontece ao longo do envelhecimento, concomitante com um declínio da atividade do proteassoma e com alterações na indução e/ou capacidade funcional de chaperonas moleculares (Landsberg, 2006).

Diversos estudos demonstram que a HSP73 está presente em grandes quantidades nos neurônios, mas que a forma induzível está presente constitutivamente apenas em astrócitos (Morrison *et al.*, 1994; Loones *et al.*, 2000). Além disso, a maior parte dos neurônios não parece ser capaz de sintetizar HSP70, em roedores, e humanos. Após choque térmico observou-se em encéfalos de ratos que a glia era capaz de expressar de 3 a 30 vezes mais HSP72 que os neurônios, e que os neurônios menores expressavam 2 a 12 vezes mais HSP72 que os neurônios maiores, mostrando uma dependência de tipo e tamanho celular na expressão desta proteína (Morrison *et al.*, 1994). Outro estudo mostrou resultados semelhantes, em experimentos com axônio gigante de lagostim a HSP73 era expressa de 4-9 vezes mais nos axônios do que na glia. Ainda não se sabe ao certo os mecanismos envolvidos, mas evidências apontam para diferenças na ligação do fator de transcrição (HSF1) ao DNA, que apesar de ter uma ativação mais tardia em cultura de neurônios corticais de ratos, era mais prolongada do que em cultura cortical de astrócitos (Nishimura e Dwyer, 1996). Além disso, os neurônios que são capazes de sintetizar a forma induzível parecem utilizar mecanismos pós transcricionais, não envolvendo o HSF1, como por exemplo uma forma constitutiva de proteína cinase tipo IV dependente de cálcio e calmodulina (CAMKIV), que é capaz de induzir robusta elevação de HSP70 em motoneurônios, células que não respondem a

estímulos típicos que ativam o HSF1, como bloqueador de glicogênio sintase cinase 3 β (GSK3 β), CAMKII α e proteína cinase C (PKC) [Taylor *et al.*, 2007a].

O fato do neurônio possuir grandes quantidades de HSP73 não o protege do estresse, pois se essa proteína está presente no corpo neuronal, e o insulto acontecer no terminal axonal, a HSP73 terá que ser transportada ao longo de todo o axônio. Isto realmente acontece, pois a HSP73 sintetizada nas células ganglionares da retina foi transportada para o nervo e trato óptico em coelhos, mas levou de 14 a 30 dias para chegar ao terminal de áreas de projeções visuais, ou seja, não sendo eficaz em insultos que exijam rápida resposta de síntese proteica (Clark e Brown, 1985).

De que forma então os neurônios sobrevivem a situações de estresse? Acontece que, apesar da maioria dos neurônios não sintetizar HSP72, as células da glia, por sua vez, sintetizam-na em grandes quantidades e muito rapidamente, além de já possuírem valores mais elevados como níveis basais, tendo essa proteína pronta para ser transportada (Loones *et al.*, 2000; Pavilik *et al.*, 2003). Primeiramente foi visto que diversas HSPs eram liberadas pela glia de lagostins em resposta ao choque térmico, tanto *in vitro* como *in vivo*, e que o axônio gigante deste animal era capaz de captar essas proteínas de forma induzível (Sheller *et al.*, 1998). Posteriormente, a indução de HSP72 por choque térmico foi avaliada (Guzhova *et al.*, 2001) em cultura de células de glioblastoma e neuroblastoma humano. Após 20 minutos de choque térmico a 44°C, houve aumento na expressão de HSP72 em glioblastomas, principalmente no núcleo e nucléolo. Em 24 h se observou um aumento ainda maior, mas com distribuição mais difusa pelo citoplasma. Essas células liberaram de 5 a 10 vezes mais HSP72 para o meio após o choque térmico, sendo que os glioblastomas controles (10⁶ células) foram capazes de liberar 5-15 pg de HSP72 em 24 h, enquanto os glioblastomas submetidos a choque térmico (10⁶ células) liberaram 25-50 pg de HSP72 em 24 h. Os neuroblastomas, quando incubados por 3 h em meio RPMI-1640 contendo 20 μ g/ml de HSP73/HSP72 biotinilada foram capazes de captar essa proteína do meio (35-40% das células), respondendo com redução de 60% na morte celular quando expostas posteriormente a choque térmico por 30 minutos comparada com o controle que não foi exposto previamente a este meio de incubação (Guzhova *et al.*, 2001). Essa liberação de HSP70 pelos astrócitos acontece via exossomos e segue mesmo após 48 h do choque térmico. A sinalização intracelular envolvida na exportação de HSP70 necessita da via cinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1 e 2) e proteína cinase B (PKB), além da diminuição da ativação da via da JNK (Taylor *et al.*, 2007b).

Nas fatias de córtex e hipocampo de camundongos transgênicos que superexpressam a HSP72 é possível observar a proteção dos neurônios e astrócitos de diversos insultos, como elevação de peróxido de hidrogênio, privação de glicose e de oxigênio e excitotoxicidade glutamatérgica (Lee *et al.*, 2001). Em cultura primária de astrócitos, a superexpressão de HSP70 foi suficiente para proteger da privação de glicose, permitindo a manutenção dos níveis de glutathiona forma reduzida (GSH) mais elevados, protegendo também contra o estresse oxidativo (Xu e Giffard, 1997). Estudos *in vivo* com ratos comprovam este efeito protetor, evitando a morte celular induzida por hipertermia corporal (aumento de 4,5°C na sua temperatura basal) nas regiões encefálicas que expressavam altos níveis de HSP72 (Belay e Brown, 2006). A superexpressão desta proteína também foi capaz de reduzir a letalidade em células do hipotálamo de camundongos causada por choque térmico de 38,2°C por 60 minutos, além de atenuar níveis de glutamato, glicerol, nitrito, produção de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e depleção de ATP, reduzindo o dano neuronal nesta região (Chen *et al.*, 2009).

1.2.2. Expressão de HSP70 em resposta ao exercício

O exercício, devido às alterações fisiológicas inerentes, é capaz de induzir a expressão de HSP70 em diferentes tecidos. Mudanças na homeostasia celular através de alterações da temperatura, pH, concentração de íons, degradação protéica, formação de radicais livres, concentração de Ca²⁺ intracelular, utilização de oxigênio, de glicose, de glicogênio e depleção de ATP são fatores que podem ativar a síntese de HSP70 durante o exercício (Febbraio e Koukoulas, 2000; Noble *et al.*, 2008).

O aumento da temperatura corporal e muscular durante o exercício parece uma maneira bastante óbvia de induzir a expressão de proteínas de choque térmico. No entanto, um estudo (Whitham *et al.*, 2007) realizado para verificar o efeito do aumento da temperatura corporal durante o exercício na expressão de HSP70 utilizou fixação de temperatura (thermal clamp) em humanos durante 2 h de exercício de corrida em água, o que evita alterações na temperatura corporal durante a realização do protocolo. Verificou-se um aumento na expressão de HSP70 nos dois grupos que realizaram exercício (com e sem o clamp), mas o grupo com elevação de 2,2°C na temperatura retal (sem fixação) teve valores significativamente maiores quando comparado com o grupo com fixação (*clamp*). Este

aumento não foi encontrado no grupo exposto somente ao aumento da temperatura de 2,2°C, mostrando que o exercício é capaz de aumentar a expressão da proteína por outros motivos além da elevação da temperatura (Whitham *et al.*, 2007). Além disso, foi verificado também que o aumento de HSP72 no tecido muscular, induzido por exercício de 60 minutos em esteira, acontecia mesmo quando este era executado em um ambiente resfriado, sem alterações na temperatura corporal (Skidmore *et al.*, 1995).

Embora os radicais livres sejam continuamente produzidos no organismo, durante a atividade física ocorre um aumento na produção de espécies ativas de oxigênio (Fisher-Wellman e Bloomer, 2009). Estudos com animais e humanos sugerem que a expressão de HSP70 pode ser uma proteção complementar ao estresse oxidativo (Smolka *et al.*, 2000; Khassaf *et al.*, 2001), pois 6 h após uma sessão de exercício de 45 minutos em cicloergômetro, o músculo esquelético apresentou uma elevação na expressão de HSP70, logo após o pico de atividade da enzima superóxido dismutase (Khassaf *et al.*, 2001).

Após a realização do exercício de forma aguda, diversos tecidos são capazes de sintetizar o mRNA e a proteína HSP72, como o encéfalo, fígado, coração, músculo, glândula adrenal e células do sistema imunitário, como os linfócitos de linfonodos mesentéricos (Febbraio e Koukoulas, 2000; Campisi *et al.*, 2003). Após exercício em cicloergômetro realizado até a exaustão (63% do VO₂ máx), os níveis de mRNA da HSP72 foram aumentados em músculos de humanos quando comparado com valores antes do início da sessão, o que foi correlacionado com baixos níveis de glicogênio muscular (Febbraio e Koukoulas, 2000). Além disso, o exercício estimula a exportação de HSP72 dos tecidos para o sangue, onde esta proteína apresenta um efeito contrário ao do intracelular, atuando como sinal de perigo, se ligando ao NF-κB e estimulando a cascata pró-inflamatória. Esse aumento na exportação da proteína está diretamente relacionado com o volume e a intensidade de exercício, pois se verificou que uma maratona é capaz de elevar a HSP72 extracelular a níveis mais altos do que qualquer outro protocolo imposto, mas, por outro lado, o exercício de alta intensidade mostrou maior exportação de HSP72 do que o de baixa intensidade, ambos quando executados por um curto período de tempo (Fehrenbach *et al.*, 2005). Quando havia suplementação de glicose, se encontrou uma atenuação nos níveis de HSP72 presentes no sangue após 120 minutos de exercício (Febbraio *et al.*, 2004), mostrando mais uma vez que alterações no metabolismo têm grande correlação com as modificações nos níveis desta proteína.

Durante o treinamento, a resposta da HSP70 pode variar muito, de acordo com a duração, volume, e intensidade do exercício executado. Quando comparamos indivíduos que treinaram em diferentes intensidades, verificamos que a expressão de HSP70 só é aumentada no grupo que treinou em alta intensidade e que apenas o mRNA desta é modificado com o treino de baixa intensidade, mas que ainda é mais baixo quando comparado com o grupo que se exercitou em alta intensidade (Liu *et al.*, 2004). A resposta da HSP70 ao exercício em indivíduos treinados pode ser maior em magnitude (Fehrenbach *et al.*, 2000) mas também em duração. Em resposta a uma sessão intensa de exercício, um indivíduo sedentário mostra níveis elevados de HSP72 até 24 h depois, enquanto indivíduos treinados por 8 semanas mostram valores 4,5 vezes maiores de HSP70 em resposta à uma sessão aguda e que se mantêm por até 14 dias, sugerindo uma adaptação da resposta da HSP70 ao treinamento. O aumento de HSP70 no músculo esquelético também pode variar durante as diferentes fases do período de treinamento, em que se observa uma elevação da produção desta proteína com um aumento do total de exercícios (Liu *et al.*, 1999) e uma diminuição durante o período de recuperação, da mesma forma que para o mRNA da HSP70 (Liu *et al.*, 2000).

Estudos em ratos exercitados em esteira têm demonstrado aumento também da expressão de HSP72 nos músculos mais exigidos durante atividade de corrida, como gastrocnêmio e sóleo, além do ventrículo esquerdo (Skidmore *et al.*, 1995), sugerindo que a expressão de HSP72 pode ser atribuído à intensidade específica com que cada grupo muscular é exigido no protocolo de exercício escolhido.

O exercício físico, além de promover mudanças em diversas funções do sistema nervoso central, como neurogênese, angiogênese, gliogênese, sinaptogênese, melhora da plasticidade sináptica quanto ao nível de liberação de neurotransmissores, neuromoduladores e neurotrofinas, defesa contra estresse oxidativo e maior permeabilidade da barreira hematoencefálica, também provoca a indução de HSP70 neste sistema (Xin *et al.*, 2010). Campisi *et al.* (2003) mostraram uma elevação significativa da HSP70 no hipocampo, no complexo vagal dorsal e no córtex pré-frontal de ratos, induzida por uma sessão de exercício exaustivo em esteira em comparação aos sedentários, o que pode proteger os neurônios após vários insultos neuronais e danos letais subsequentes. O treinamento de três semanas em esteira protegeu contra infarto causado por oclusão da artéria cerebral média de ratos aumentando a expressão de HSP72 e reduzindo a apoptose neuronal e o volume de infarto (Liebelt *et al.*, 2010). O treinamento pelo mesmo período também protegeu os ratos de diversas maneiras contra infarto induzido por calor, diminuindo a hipotensão arterial, a

isquemia cerebral, o dano neuronal, e também aumentou a sobrevivência. Essa resposta foi associada com o aumento de HSP72 em diversas áreas encefálicas: córtex frontal, hipocampo, estriado, núcleo do trato solitário e hipotálamo (Chen *et al.*, 2007).

Um aumento na expressão de HSP72 no hipocampo e no córtex pré-frontal, concomitante com uma diminuição da enzima óxido nítrico sintase induzível foi encontrado em ratos que realizaram treinamento de natação por quatro semanas, mostrando, assim, que a HSP70 podia inibir a expressão de iNOS pela inibição da ativação do NF- κ B (Xin *et al.*, 2010). O exercício do tipo forçado também se mostrou mais eficiente na proteção neuronal quando comparado com o exercício voluntário, pois somente o exercício em esteira (forçado) foi capaz de causar neuroproteção após infarto por reperfusão, induzindo HSP70 e reduzindo o volume de infarto (Hayes *et al.*, 2008). O encéfalo também é capaz de liberar HSP72 para o meio extracelular em resposta ao exercício de longa duração e intensidade moderada, mas seu papel biológico ainda precisa ser elucidado (Lancaster *et al.*, 2004).

Os estudos sugerem que a expressão de HSP70 tenha uma forte influência nas vias metabólicas e inflamatórias do hipotálamo, e que o exercício é capaz de induzir esta proteína, protegendo, assim, o sistema nervoso contra diversos danos e desempenhando, portanto, um papel potencial na prevenção e no tratamento da obesidade e diabetes mellitus do tipo 2. Deve-se portanto verificar a modalidade e intensidade de exercício que seja capaz de induzir HSP70 no hipotálamo e também possíveis alterações no metabolismo energético.

2. OBJETIVOS

2.2. Objetivo Geral

Avaliar a expressão de HSP70 no hipotálamo de ratos após exercício e treinamento de natação em diferentes intensidades e identificar os mecanismos desta expressão relacionados com o metabolismo energético.

2.3. Objetivos Específicos

→ Verificar a influência de diferentes intensidades de exercício de natação na expressão de HSP70 no hipotálamo (por Western Blot), acompanhando em diferentes tempos.

→ Verificar a influência do treinamento físico de natação em diferentes intensidades na expressão de HSP70 no hipotálamo (por Western Blot), apenas 72 h após a última sessão.

→ Identificar as áreas hipotalâmicas (por imunofluorescência) que podem expressar HSP70 induzida pelo exercício físico.

→ Verificar a correlação da expressão de HSP70 (por Western Blot) induzida pelo exercício com o metabolismo da glicose e do lactato (glicemia, laticemia, captação de glicose e lactato pelo hipotálamo utilizando radioisótopos, conteúdo de glicogênio do hipotálamo).

→ Verificar a influência do L-lactato (intravenoso e intraperitoneal) na expressão de HSP70 pelo hipotálamo (por Western Blot).

→ Verificar a influência dos receptores alfa adrenérgicos (bloqueio de alfa1, 2 e duplo) na expressão de HSP70 (por Western Blot) induzida pelo exercício.

3. MÉTODOS

3.1 Animais

Este projeto (nº 21082) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (03/10/2012) [anexo 1].

Foram utilizados 288 ratos (mínimo de 4 animais por análise) Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *Albinus*), adultos (60 dias), machos, de 250-300g, obtidos no biotério central do ICBS/UFRGS (CREAL), mantidos em caixas de polipropileno (33x17x40 cm), cinco animais por caixa, em um ciclo de claro/escuro de 12 h e temperatura de 22±2°C. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, dieta comercial padrão para ratos de laboratório, contendo aproximadamente 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos. Os procedimentos experimentais seguiram as normas éticas brasileiras (Goldim, 1995) e os protocolos de exercício físico estavam de acordo com o Livro de Modelos Animais de Exercício Físico desenvolvido pela Sociedade Americana de Fisiologia (Kregel *et al.*, 2006). Os cuidados com os animais foram de acordo com a Lei Arouca (11794/2008) e as condições experimentais foram as mesmas descritas em metodologias já utilizadas pelo grupo de pesquisa (Silveira *et al.* 2006; Krause & Homem de Bittencourt Jr, 2008).

A morte dos animais por decapitação foi escolhido para eutanásia por ser eficaz na perda imediata de reflexos, além de produzir mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos. Nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação. A morte dos animais sob anestesia é incompatível com nossos experimentos, pois todos os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores (Brown 2005; Saha 2005), o que afeta também as concentrações de HSP70 (Febbraio 2004).

3.2 Protocolos de exercício

A escolha pelo protocolo de natação deveu-se, primeiramente, por ser menos estressante para o animal do que o treinamento em esteira, como já foi demonstrado anteriormente (Campisi *et al.*, 2003). Além disso, durante o exercício, tende a haver uma elevação da temperatura corporal, o que também pode induzir a expressão de HSP70, como citado anteriormente. Com o protocolo de natação, podemos manipular a temperatura da água (30 ± 1 °C), o que evita que os animais tenham elevações na temperatura corporal. Na figura 3 constam os dados da temperatura retal dos animais nas diferentes intensidades de exercício, avaliadas com este mesmo protocolo (projeto n° 2008110, aprovado pelo comitê de ética), onde observamos que não houve elevação da temperatura corporal após o exercício de natação, independente da intensidade.

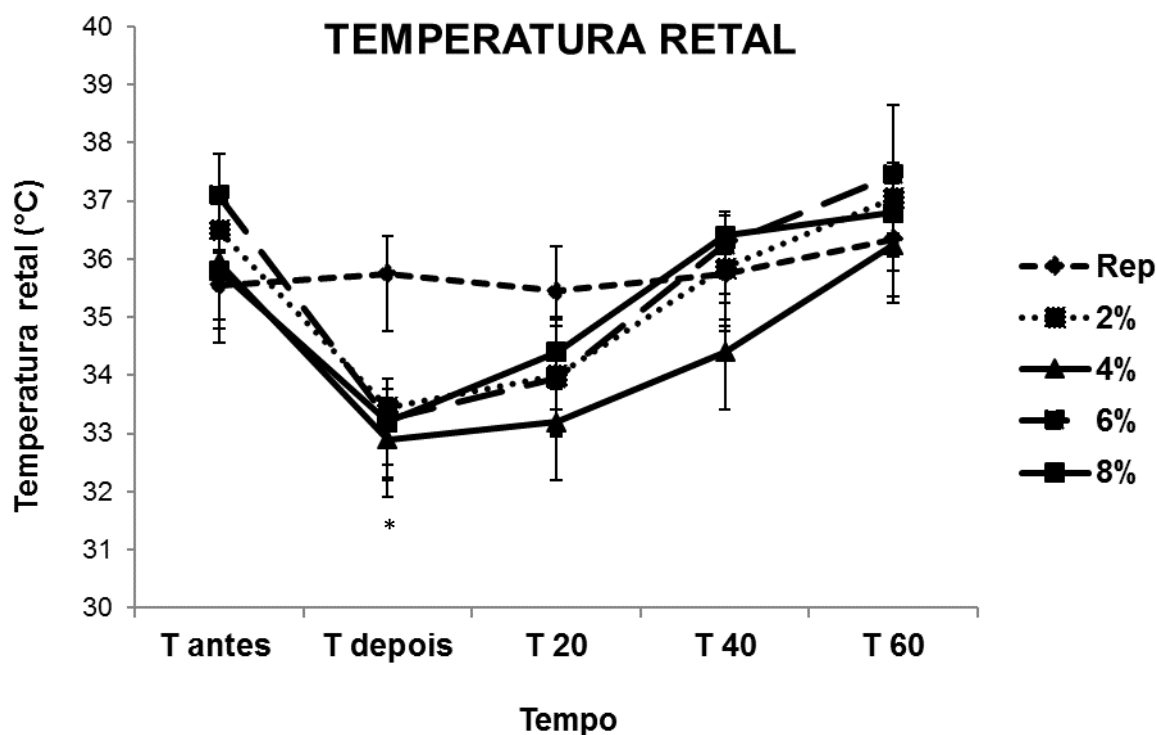


Fig. 3. Avaliação da temperatura retal em animais submetidos ao exercício de natação, com temperatura da água constante (30 ± 1 °C) antes do início da sessão (T antes) e nos diversos tempos após o início: imediatamente (T depois), 20 (T20), 40 (T40) e 60 (T60) minutos. Rep (repouso), 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal adicionada à cauda. (*) diferente ($p < 0,05$) do repouso no mesmo tempo. Teste da ANOVA de medidas repetidas, seguido de *post hoc* de Tukey. Dados apresentados como média \pm DP.

3.2.1 Exercício agudo

Os ratos foram submetidos a exercício/protocolo de natação de 20 minutos em tanques de natação de vidro (45x45x56cm) com capacidade para que 4 animais nadem simultaneamente e individualmente (20x20x56cm para cada animal) nos espaços preenchidos com 45cm de água a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os animais foram primeiramente divididos aleatoriamente em grupos de 5 animais cada. Em quatro grupos, os animais tiveram a adição de contrapeso como modulador da intensidade de nado (chumbinhos de pesca fixados com fita adesiva à base da cauda dos mesmos; não são usadas borrachas para não interromper a circulação da cauda), que correspondiam a 2, 4, 6 e 8% do peso corporal total de cada animal (Fig. 4). Em outro grupo, o animal (controle, sem exercício) foi mantido individualmente em um dos tanques de natação com preenchimento de apenas 5 cm de água na mesma temperatura, para simulação do estresse de permanecer na água, além da exposição à mesma temperatura (grupo repouso). Todos os animais foram previamente adaptados ao ambiente de natação em três sessões de oito minutos de adaptação sem carga, com a finalidade de minimizar a interferência de uma resposta ao estresse nos dados analisados. Após um dia de intervalo, realizou-se o protocolo de exercício agudo. Após os primeiros resultados de expressão de HSP70, optou-se pela escolha de apenas 3 grupos, o repouso (controle), o 4% (média intensidade) e o 8% (alta intensidade), já que os grupos intermediários não diferiam estatisticamente do controle, para minimizar o uso de animais.

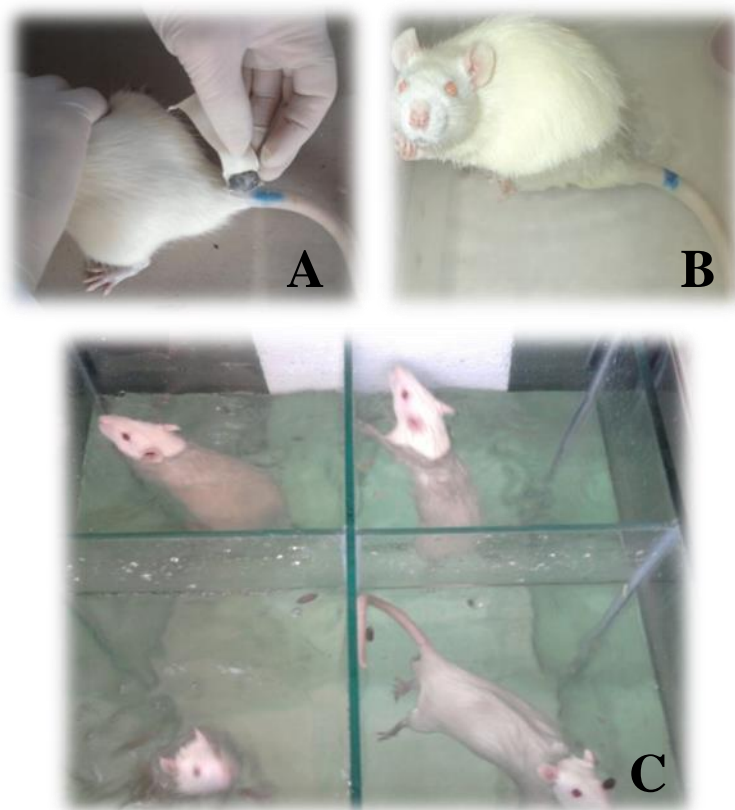


Fig. 4. Imagens demonstrativas do protocolo de exercício. **A.** Carga atada à cauda do rato. **B.** Água rasa onde dica o repouso. **C.** Tanque de natação de vidro, onde 4 animais nadam simultaneamente com 45 cm de água.

3.2.2 Treinamento

Para os experimentos de treinamento, os ratos foram submetidos a treinamento de natação (20 min por dia, 5 dias por semana, durante 8 semanas) com aumento de intensidade realizado de forma progressiva (Tabela 1) em tanques preenchidos com água a 30 ± 1 °C. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 5 cada, sendo 4 grupos com adição de contrapeso de chumbinhos (2%, 4%, 6% e 8%), como modulador da intensidade de nado, e um grupo controle, como descrito acima. Todos os animais foram previamente adaptados ao ambiente de natação em 5 sessões de 20 minutos de adaptação sem carga, que aconteceu na primeira semana do período experimental. Os grupos foram posteriormente reduzidos para repouso, 4% e 8%, da mesma forma que no experimento com exercício de efeito agudo.

Tabela 1 - Progressão do treinamento: distribuição das cargas realizadas em uma progressão de treinamento por semana (SEM), para a adaptação dos animais a cargas mais intensas. % referente à porcentagem do peso corporal do animal atado à cauda como sobrecarga.

	1°SEM	2°SEM	3°SEM	4°SEM	5°SEM	6°SEM	7°SEM	8°SEM
% DE PESO CORPORAL NA CAUDA	REP	REP	REP	REP	REP	REP	REP	REP
	-	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%
	-	2%	4%	4%	4%	4%	4%	4%
	-	2%	4%	6%	6%	6%	6%	6%
TEMPO (min)	-	2%	4%	6%	8%	8%	8%	8%
	20	20	20	20	20	20	20	20

Os tempos de morte dos animais após o exercício foram definidos a partir de experimentos realizados sobre a cinética da expressão da HSP70 no sistema nervoso central (Guzhova *et al.*, 2001; Campisi *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2007). A expressão desta proteína induzida por estresse começa cerca de 1h após choque térmico em astrócitos, que passam a transferir a HSP70 para os neurônios que, por sua vez, aumentam a expressão de HSP70 a partir de 4h. Deve-se salientar que estes estudos foram realizados em cultura de células e para outros tecidos encontram-se picos de expressão com 12 h após o choque térmico. Sendo assim, nos tempos escolhidos (2, 6 e 12 h) é possível acompanhar se tal mecanismo também ocorre no hipotálamo, induzido pelo exercício. A avaliação imediatamente após o exercício é com o intuito de avaliar os valores basais, e para confirmar se em todos os animais os valores basais são similares. Para avaliar somente os efeitos do treinamento, sem que haja interferência da última sessão, foi utilizado um grupo com exercício de efeito crônico por 72 h (crônico 72 h), para efeito comparativo do treinamento com apenas uma sessão de exercício. A organização de todos os grupos experimentais está apresentada na Figura 5.

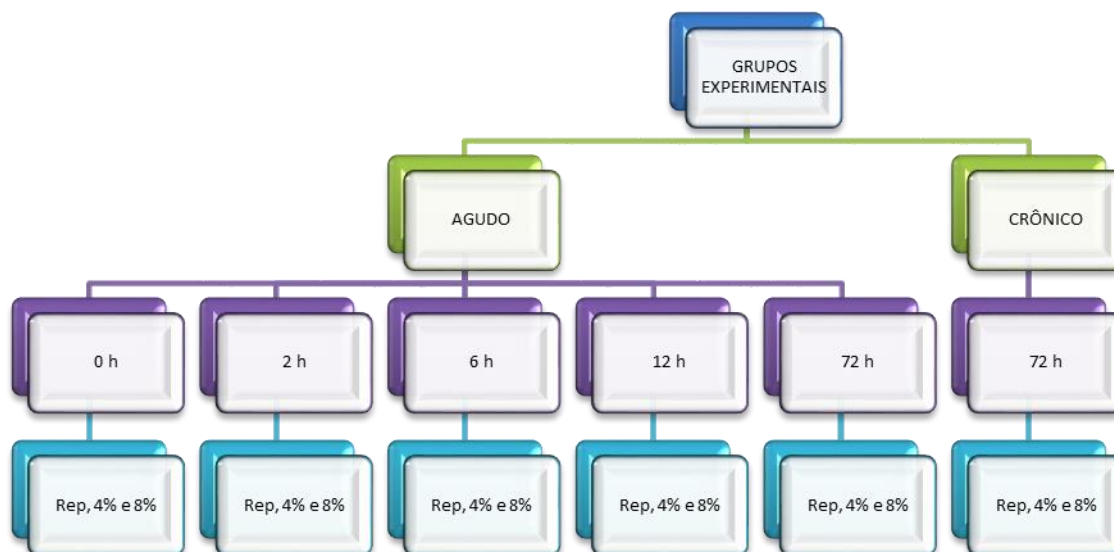


Fig. 5. Organização dos grupos experimentais. Os grupos foram divididos em “agudo” e “crônico”. No grupo agudo, a morte dos animais ocorre imediatamente, 2 h, 6 h, 12 h e 72 h após uma única sessão de exercício. No grupo crônico, a morte dos animais ocorre somente 72 h após a última sessão de exercício. Todos os grupos dividem-se em 3 intensidades: o repouso, 4 e 8% de seu peso corporal atado a cauda.

3.3 Dosagem de lactato e glicose

Em diferentes tempos após o exercício, foram extraídos 25 μ L de sangue do animal por punção caudal para medidas de lactato e glicose. As extrações foram realizadas nos animais submetidos ao exercício físico agudo, assim como nos animais submetidos ao treinamento de 8 semanas. O animal era colocado sobre a mesa, coberto com uma toalha de modo que ficasse apenas a cauda visível e então era feito um pequeno furo com lanceta específica (Accutrend® Roche), o que durava apenas 10 segundos. O sangue era coletado diretamente nas fitas de glicose/lactato e analisadas imediatamente em lactímetro (Accutrend® Lactate, Roche), sendo o resultado expresso em mmol/L de sangue, e em glicosímetro (On Call Plus), com resultado expresso em mg/dL.

3.4 Western blot

Para determinação da expressão de HSP70 por Western Blot, o hipotálamo foi extraído por inteiro [limite anterior: quiasma óptico (Bregma -0,12 mm), limite posterior: núcleo ventral túberomamilar (Bregma -4,44 mm), limite superior: borda superior da comissura anterior, limite inferior: quiasma óptico] e coletado em tubo tipo Eppendorf contendo 350µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% e 1µl de cada inibidor de protease (fluoreto de fenilmetilsulfonila-PMSF 100µM, N-tosil-L-lisina clorometil-cetona-TLCK 20µM, aprotinina 2µg/mL e leupeptina 2µg/mL) para serem homogeneizados com seringa de insulina. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 15.000 g por 1 min a temperatura ambiente e o sobrenadante coletado. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976), e as amostras foram posteriormente diluídas em SDS 0,1% para uma concentração de 2µg/µl, e depois com tampão de amostra [50 mM Tris pH 6,8, SDS 10% (w/v), glicerol 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 10% (v/v) e 2 mg/mL azul de bromofenol], para obter a concentração final de 1µg/µl. Antes de aplicá-las no gel, as amostras foram fervidas a 100°C por 5 min para desnaturação completa das proteínas. Quantidades iguais de proteína (~40µg por poço) foram aplicadas em gel de poliácridamida 10% para separação durante 4 h e utilizando corrente elétrica constante a 15 mA por gel. Foi utilizado o sistema vertical Slab Gel Mini-Protean TetraCell (BIO-RAD) preenchido com tampão de corrida contendo Tris a 25 mM e SDS a 1% (m/v). Foi usado como marcador de peso molecular, 5 µL de mistura de proteínas recombinantes pré-coloridas (cód. RPN800E, GE Health Care) por gel. Para a realização do procedimento de eletrotransferência, pelo qual ocorre a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (GE Health Care), foi utilizado o sistema refrigerado Blot Cell (BIO-RAD) a 100V constantes por 1 h e 30 min. A confirmação do sucesso dos procedimentos descritos foi obtida pela coloração da membrana de nitrocelulose com Vermelho Ponceau S (Red Ponceau S, sal de sódio 0,3%, Sigma) em solução de ácido tricloroacético a 3% e, em seguida, descoradas com solução TEN (Tris-EDTA-NaCl a respectivamente 50, 5 e 150 mM)-Tween 0,1% (v/v).

O procedimento de *immunoblotting* foi realizado inicialmente incubando as membranas de nitrocelulose por 30 min com tampão de bloqueio (leite em pó desnatado a 0,5% em TEN-Tween 0,1%) em temperatura ambiente; as membranas foram então colocadas, sob agitação, com anticorpo primário específico, a 4°C, overnight. Foram feitas 3 lavagens consecutivas de

15 min com TEN-Tween 0,1%, e então mais 1 h de incubação se seguiu sob agitação, a 4°C, com o anticorpo secundário. Mais 3 lavagens foram feitas com TEN-Tween 0,1% e a imunodeteção foi realizada por quimiluminescência com uso de Luminol, ácido p-coumárico e H₂O₂, sendo a quimiluminescência fotodocumentada (60 fotos, 1foto/10seg) e as imagens quantificadas com auxílio do sistema automático ImageQuant 350 (GE Health Care).

Para determinar a expressão de HSP70 foi utilizado anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma cód. H5147, produzido em camundongo, Anti-HSP70), que reconhece tanto a forma induzível de 72-kDa quanto a forma constitutiva de 73-kDa, diluído 1:1000 em tampão de bloqueio, seguido de anticorpo conjugado com peroxidase HRP (Sigma cód. A9044, Anti-IgG de camundongo), a uma diluição de 1:10000 em tampão de bloqueio.

Como normalizadores, foram utilizados a β -Actina ou o GAPDH diluídos 1:500 com tampão de bloqueio. Foi realizada incubação com anticorpo anti- β -actina produzido em cabra (cód. 1616, Santa Cruz), seguido do secundário anti-IgG de cabra marcado com peroxidase (cód. A5420, Sigma), diluído 1:10000 com tampão de bloqueio, ou anti-GAPDH produzido em coelho (cód. G9545, Sigma) e com o secundário anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (cód. A0545, Sigma), diluído 1:20000 com tampão de bloqueio. Os dados serão apresentados como unidades arbitrárias da razão obtida entre o volume de pixels de cada banda de interesse pela quantidade de pixels detectada nas respectivas bandas das proteínas normalizadoras.

3.5 Imunofluorescência

Esta análise *in situ* foi utilizada para verificar a localização da HSP70 que se mostrou aumentada no hipotálamo do animal exercitado com 8% de carga. Nestes estudos, foi investigada a expressão de HSP70 apenas com grupo 8% e o com o repouso (controle). Foram realizadas secções seriadas de todo o hipotálamo para identificar em quais núcleos a imunomarcção estaria localizada. Cortes alternados foram empregados para imunofluorescência ou corados com hematoxilina e eosina para facilitar o reconhecimento das estruturas, utilizando como referência o atlas do Paxinos e Watson, 2009.

Os animais foram anestesiados com xilazina 10 mg.kg⁻¹ (0,05 mL de xilazina 2% para 100 g de rato) e cetamina 90 mg.kg⁻¹ i.p. (0,09 mL de cetamina 10% para 100 g de rato) para

a realização da perfusão transcárdica. Foi injetado inicialmente solução salina tamponada, PBS (NaCl - 136,8 mM, KCl - 2,7 mM, KH₂PO₄ - 0,9 mM, Na₂HPO₄ - 6,4 mM, pH 7,4) com auxílio de uma bomba de perfusão, até que a salina liberada da perfusão através do ventrículo direito estivesse livre de sangue (300 ml em média). A seguir injetou-se uma solução de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M (pH7,4) para fixação do tecido (500 ml em média). O encéfalo foi, então, extraído e pós-fixado por imersão em paraformaldeído 4%, por 4 h à temperatura ambiente. Os tecidos foram crioprotetidos, primeiro em solução de sacarose 15% seguido de sacarose 30%, diluídas em tampão fosfato 0,1M (pH7,4). O tecido foi então colocado em isopentano e congelado em nitrogênio líquido. Os cortes foram feitos em criostato (Leitz) com espessura de 30µm.

Os cortes foram incubados por 15 min com glicina 0,01 M em PBS, para minimizar a fluorescência causada pelo paraformaldeído, seguido de incubação por mais 15 min com PBS contendo 0,1% de albumina (cód. A4503, Sigma) e 0,2% de Triton x-100 para bloqueio dos sítios inespecíficos. Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários, diluídos na solução de bloqueio, por 1 h. Para controle negativo, utilizou-se somente a solução de bloqueio. Foi feita marcação dupla, com o anti-HSP70 (1:200) feito em camundongo (cód. H5147, Sigma) e o anti-GFAP (1:100) feito em coelho (cód. G9269, Sigma) para evidenciar possíveis colocalizações de expressões em astrócitos. Seguiram-se 3 lavagens de 15 min com PBS e foi, então, incubado com os anticorpos secundários, que eram marcados com fluoróforos diferentes. Para marcar a HSP70 utilizamos o anti-IgG de camundongo (1:400) conjugado com CY3 (cód. C2181, Sigma), e para GFAP, o anti IgG de coelho (1:400) conjugado com FITC (cód. Ab79063, Abcam). Foram feitas mais 3 lavagens de 15 min, e aplicado o DAPI fluorshield (F6057, Sigma), que marca os núcleos e também serve como meio de montagem para colocação da lamínula. As fotomicrografias foram obtidas no microscópio IX81 (Olympus), com filtros específicos e com tempo de aquisição de 5 segundos. O controle negativo de cada corte em sequência foi descontado da imagem positiva, como background.

3.6. Captação de glicose e lactato radiomarcados

Os estudos relativos à captação de glicose foram realizados com 2-desóxi-D-glicose (2-DG) triciada, 2-[1,2-³H (N)]-desóxi-D-glicose (cód. NET32800, Perkin Elmer),

radioatividade específica: 8 Ci/mmol, 1 mCi/mL; N = nominalmente marcada (especificamente nos 2 hidrogênios do C-2); 1,57 µCi/100 g de rato. Estes estudos foram destinados à investigação da captação de glicose pelo hipotálamo dos animais sedentários que realizaram uma sessão de exercício e foram analisados nos tempos 0 h, 12 h, 72 h e dos animais que treinaram por 8 semanas, sendo analisados 72 h após a última sessão de exercício. A captação de lactato foi realizada com [¹⁴C] ácido láctico (NEC59905, Perkin Elmer), radioatividade específica: 118,4 mCi/mmol, 0,1 mCi/ml. Estes estudos foram destinados à investigação da captação de lactato pelos tecidos que utilizam intensamente esta molécula como fonte de energia, assim sendo, foram utilizados o fígado, o coração, e o foco principal deste estudo, o hipotálamo dos animais do grupo agudo 0 h.

Os animais receberam injeção intraperitoneal com os radioisótopos diluídos em PBS, em um volume em µl igual ao seu peso corporal em gramas (1µl/1g), 30 min antes da morte. No grupo agudo 0 h, a injeção foi aplicada 10 min antes do início da sessão de exercício, que durou 20 min, e imediatamente ao final da atividade, ocorreu a morte do animal e extração dos tecidos e do sangue, que foi centrifugado a 4000 rpm para separação do plasma, que foi colocado imediatamente em tubos tipo eppendorf e congelados até o final do experimento.

Para leitura da presença de substância radiomarcada no plasma, este foi aplicado diretamente (100 µL) em flaconete e completado com líquido de cintilação (*Perkin Elmer*). Essas amostras foram retiradas para o cálculo da radioatividade específica, levando em consideração a glicose “fria” circulante já presente. O coração foi exsanguinado e, como o fígado, lavado com PBS. Os tecidos foram pesados e então homogeneizados em água milliQ (em volume 5 vezes maior que o tecido). O volume total dos homogenatos foi centrifugado a 15.000 x g por 1 min. Do sobrenadante, foram coletados 100 µL completando-se com líquido de cintilação (*Perkin Elmer*) no flaconete. Para o cálculo da radioatividade específica, utilizou-se a seguinte equação: [(dpm/mL de radioatividade plasmática) / (µmol/mL de glicose plasmática)].

Os resultados de radioatividade específica de cada animal (em dpm/µmol) foram utilizados para calcular a quantidade de glicose (em µmols) captada em cada tecido analisado. A radioatividade foi lida em contador *RACKBETA liquid scintillation counter* FLEXI-VIAL (LKB Wallac 1209) em dpm e os resultados convertidos para µmol ou nmol dependendo do caso.

3.7 Captação de glicose e lactato *ex vivo*

Imediatamente após o término da sessão de exercício agudo, os animais foram mortos e seu hipotálamo retirado (assim como para Western Blot). Este foi pesado e colocado em frascos de Warburg modificados (com poço de vidro central com capacidade para 500 µL), contendo 500µl de solução de Ringer Bicarbonato (NaCl 118 mM, KCl 4,61 mM, KH₂PO₄ 1,19 mM, CaCl₂.2H₂O 2,5 mM, MgSO₄.7H₂O 0,74 mM, NaHCO₃⁻ 25 mM, pH 7,4) a 37 °C, mais 1 µl de 2-[1,2-³H (N)]-desóxi-D-glicose e 1µl de [¹⁴C] ácido láctico, posteriormente gaseificada com carbogênio (5% de CO₂/95% de O₂) e incubada por 90 min em constante agitação (100 rpm), em banho a 37°C. Outros dois experimentos foram realizados da mesma maneira, mas com 10 ou 20 mM de L-lactato (L7022, Sigma) adicionando ao meio. Ao término da incubação, o tecido foi lavado em solução de Ringer gelada, para tirar o excesso de radioatividade absorvida ao tecido. Depois de seco em papel filtro, o tecido foi homogeneizado em água milliQ (em volume 10 vezes maior que o tecido) com seringa de insulina. As amostras de tecido e também do meio de incubação foram centrifugadas a 15000 g por 1 min, e 100 µl do sobrenadante foi coletado e colocado em flaconete com líquido de cintilação *Perkin Elmer*, para então ser lido em contador *RACKBETA liquid scintillation counter FLEXI-VIAL* (LKB Wallac 1209) em dpm. Para o cálculo final, utilizou-se a seguinte equação: $[(\mu\text{mol/g de tecido}) / (\text{dpm/mL de radioatividade presente no meio})]$.

3.8 Extração e dosagem de glicogênio

Os hipotálamos (em média 50 mg) foram extraídos dos animais submetidos aos protocolos de exercício agudo, dos grupos repouso, 4% e 8%, nos tempos 0 h, 12 h e 72 h. Os tecidos frescos foram colocados em tubos de ensaio contendo 1 ml de KOH 30%, foram fechados e colocados em banho fervente a 100°C até dissolver o tecido. Foi então adicionado 3,1 ml de etanol 90%, os tubos foram invertidos para misturar a amostra que fica levemente precipitada ao fundo, e passaram por mais 10 min no banho a 70°C. As amostras foram então colocadas em gelo para precipitação das moléculas de glicogênio por 1 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min e os sobrenadantes descartados. As

amostras foram ressuspensas em 1 ml de etanol 70% e colocadas novamente em gelo por mais 1 h. Seguiu-se a mesma centrifugação acima e os sobrenadantes foram descartados. Foi preparada uma curva padrão a partir da solução estoque de glicogênio 1 mg / mL diluída em água milliQ. As amostras e a curva foram ressuspensas em 50 µl de água milliQ, foi adicionada a mesma quantidade de ácido clorídrico 4 N e foram aquecidas por 1 h em banho fervente a 100°C para induzir a hidrólise das moléculas de glicogênio. A solução foi neutralizada com 70µl de carbonato de sódio 2 M para dosagem por kit de glicose a partir da formação de peróxido de hidrogênio e ácido glicônico por ação da glicose oxidase (método enzimático ou de ponto final). A placa foi incubada por 10 min a 37°C e a leitura realizada a 490 nm em leitora de microplacas de ELISA (Bio-Rad, modelo Benchmark). Os resultados de concentração de glicogênio hipotalâmico foram expressos em mg/g de tecido fresco.

3.9 Injeção de L-lactato

A injeção de L-lactato (cód. L7022, Sigma) foi realizada para verificar se os resultados obtidos pelo Western Blot poderiam ser mimetizados apenas modificando a concentração sanguínea de lactato, para os valores encontrados em diferentes intensidades de exercício. Os grupos foram então separados pela concentração de lactato injetada: PBS, 3, 5, 10 e 20 mmol/L de L-lactato. O volume injetado de PBS em microlitros foi igual ao peso do animal em gramas (1µl/1g). O cálculo para tanto segue no exemplo abaixo:

Para saber o volume médio de sangue do animal, considerou-se: $0,06 \times \text{peso} + 0,77$ (Lee e Blaufox, 1985).

Então para injetar 20 mmol/L em um rato de 300g: $0,06 \times 300 + 0,77 = 18,77$ ml de sangue.

Se $0,300 \times \text{ci} = 18,77 \times 20 = 1251,33$, então $112,06$ (PM L-lactato) $\times 1251,33 / 1000 = 140,22$.

Como $140,22 \times 0,300 / 1000 = 0,042$ g, portanto, 42mg em 300µl são injetados em um animal de 300g.

Os animais receberam a injeção intraperitoneal nas concentrações designadas para cada grupo e foram mortos 12 h após, em cujo tempo encontramos diferença na expressão de HSP70 no grupo exercitado. O hipotálamo foi retirado e processado para Western Blot. Este

mesmo experimento também foi repetido injetando L-lactato intravenoso, utilizando-se a veia caudal.

3.10 Injeção de D-lactato

Para verificar se o D-lactato era capaz de competir com o L-lactato circulante e bloquear o efeito de aumento de HSP70 no grupo 8%, realizamos a injeção deste, intravenosa (veia caudal), 10 min antes do início da sessão aguda de exercício.

Os grupos repouso, 4% e 8% tem valores médios de lacticemia de 1, 5 e 10 mmol/L respectivamente. Foi então injetado D-lactato (cód. 71716, Sigma) nas concentrações proporcionais de cada grupo, que fossem suficientes para competir com o L-lactato circulante. Como L-lactato tem uma afinidade maior por seu transportador, foi colocado exatamente o dobro dos valores de D-lactato. Ou seja, o grupo repouso apenas recebeu PBS, pois não tem alterações na lacticemia depois de 20 min, o grupo 4% recebeu 10 mmol/L de D-lactato, e o grupo 8% recebeu 20 mmol/L. O cálculo da concentração e volume foi o mesmo realizado no L-lactato, citado acima. Após 12 h do término da sessão de exercício, os animais foram mortos e o hipotálamo processado para Western blot.

3.11 Bloqueadores adrenérgicos

Para verificar se a via α -adrenérgica pudesse ser um possível mecanismo que determinasse a alteração da expressão de HSP70 no hipotálamo 12 h após o exercício, realizamos o mesmo protocolo de exercício agudo, com as 3 diferentes intensidades. Realizamos o bloqueio α -adrenérgico do receptor α_1 , do receptor α_2 e o bloqueio duplo, dos dois receptores ao mesmo tempo.

O fármaco utilizado para bloqueio do receptor α_1 foi prazosina, 1 mg/kg de peso (cód. P7791, Sigma), enquanto para α_2 foi utilizado a Ioimbina, 1 mg/kg de peso (cód. Y3125, Sigma) [Flavahan e McGrath, 1980]. Para o bloqueio duplo foram utilizadas as duas drogas juntas, diluídas em PBS. O volume injetado em microlitros foi igual ao peso do animal em gramas (μ l/g). A administração foi via intraperitoneal, 30 min antes de o animal iniciar a

sessão de exercício. Os animais foram mortos 12 h após o término da sessão, e o hipotálamo foi processado para Western Blot.

3. 12 Análise estatística

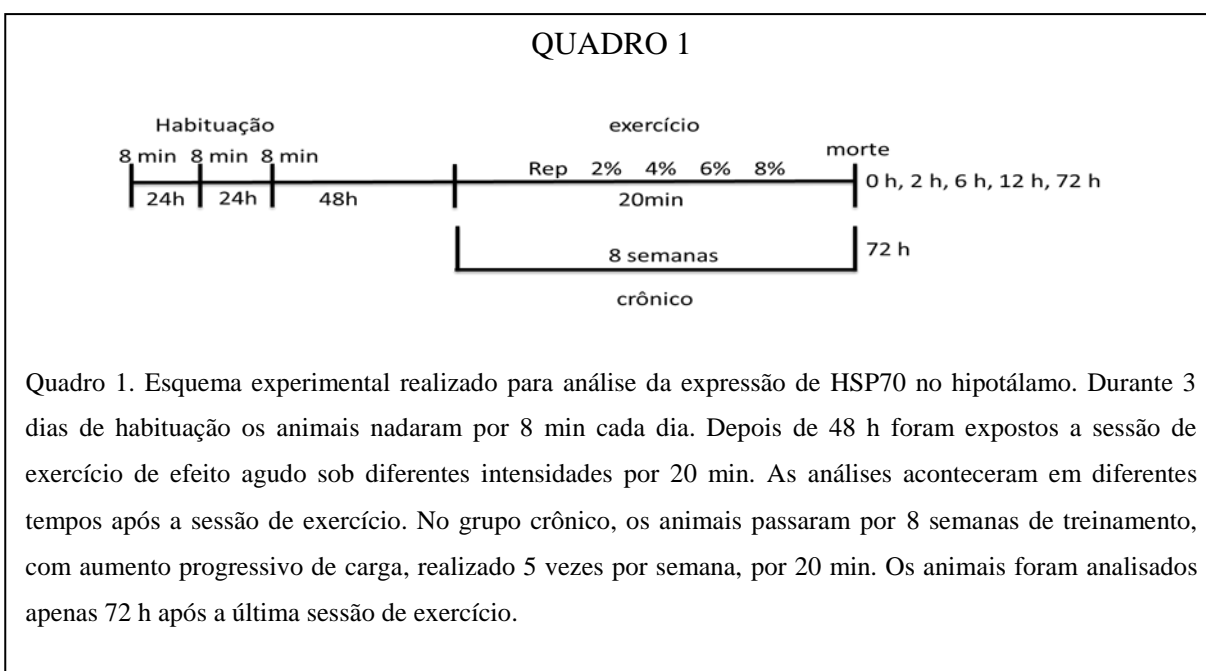
Nos experimentos de Western Blot foi realizado teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, como os dados apresentavam distribuição normal, foi então utilizado o teste de variância ANOVA de uma via, seguido de teste *post hoc* de LSD, para comparar as diferentes intensidades (Rep, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado a cauda). Para os demais experimentos, que possuíam além do fator intensidade, também o tratamento (diferentes concentrações de L-lactato, D-lactato ou diferentes bloqueadores de receptores adrenérgicos), ou ainda tempos diferentes de análise, foi utilizado teste da ANOVA de duas vias e, se significativo, o teste de *post hoc* de LSD. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os dados foram apresentados como média \pm DP. Para as correlações foi utilizado o nível de significância do teste de Pearson e o r^2 da equação da reta. Os dados foram processados utilizando o software *Statistica* 10.0.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do exercício e do treinamento de diferentes intensidades na imunodeteção de HSP70 no hipotálamo de ratos.

Os dados foram obtidos de animais que foram divididos em grupos exercitados de forma aguda, e grupos que passaram por 8 semanas de treinamento, com incremento progressivo de carga. Nos grupos agudos, as mortes ocorreram imediatamente, 2 h, 6 h, 12 h e 72 h após uma única sessão de exercício, e nos grupos crônicos, a morte ocorreu apenas 72 h após a última sessão (Quadro 1). As intensidades foram divididas em 2, 4, 6, e 8% do peso corporal do animal atado à base da cauda, além do animal sedentário, que permaneceu em água rasa. O hipotálamo foi então extraído, e processado para Western Blot, para verificar a expressão de HSP70, assim como do normalizador, a actina.

Os valores de HSP70 apresentaram mudanças significativas 12 h após a execução do exercício agudo, onde encontramos um aumento na expressão desta proteína no grupo que se exercitou com maior intensidade, quando comparado com os grupos repouso, 2% e 4% (Figs. 6 a 11). Esse aumento encontrado correlaciona-se positivamente ao aumento da intensidade do exercício (Fig. 10), ou seja, quanto maior a intensidade do exercício, mais alta a expressão de HSP70 no hipotálamo. Nos demais tempos não houve diferença significativa, sendo assim, até 6 h depois da sessão, não há mudança na sua expressão, assim como 72 h depois, quando os valores, que estavam elevados com 12 h, já voltaram a valores basais.



Quadro 1. Esquema experimental realizado para análise da expressão de HSP70 no hipotálamo. Durante 3 dias de habituação os animais nadaram por 8 min cada dia. Depois de 48 h foram expostos a sessão de exercício de efeito agudo sob diferentes intensidades por 20 min. As análises aconteceram em diferentes tempos após a sessão de exercício. No grupo crônico, os animais passaram por 8 semanas de treinamento, com aumento progressivo de carga, realizado 5 vezes por semana, por 20 min. Os animais foram analisados apenas 72 h após a última sessão de exercício.

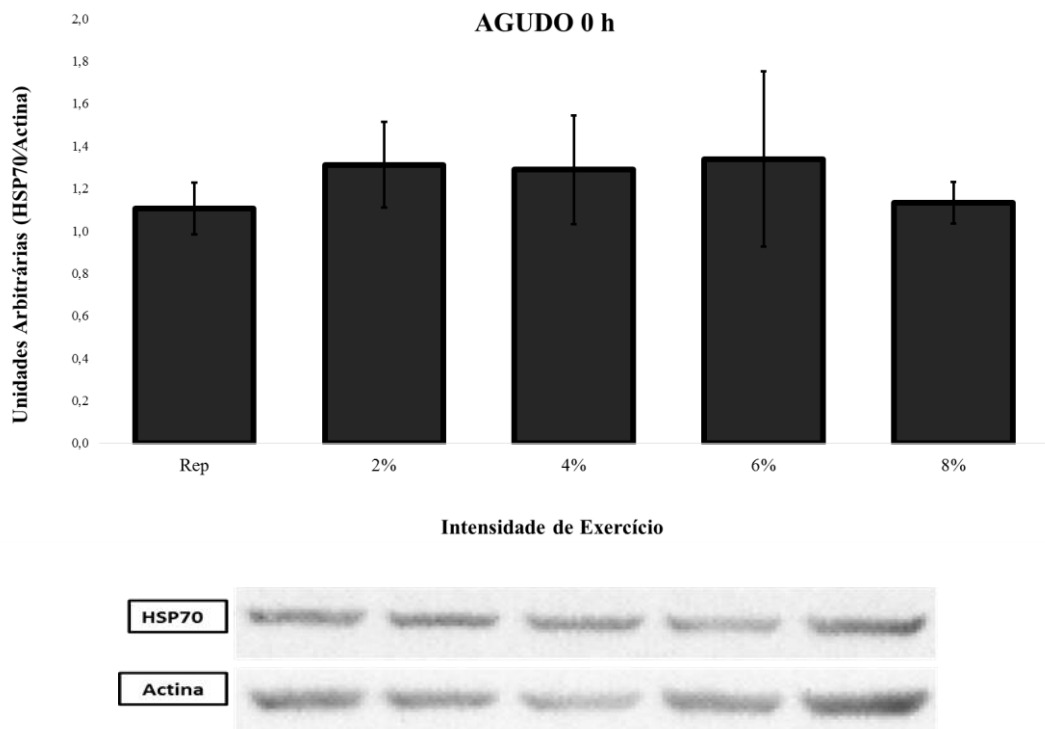


Fig. 6. Imunodeteção de HSP70 ($n=6$) no hipotálamo de ratos imediatamente após sessão aguda de exercício de diferentes intensidades (Rep, 4%, 6% e 8%). Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,576$). Teste da ANOVA de uma via. Dados apresentados como média \pm DP.

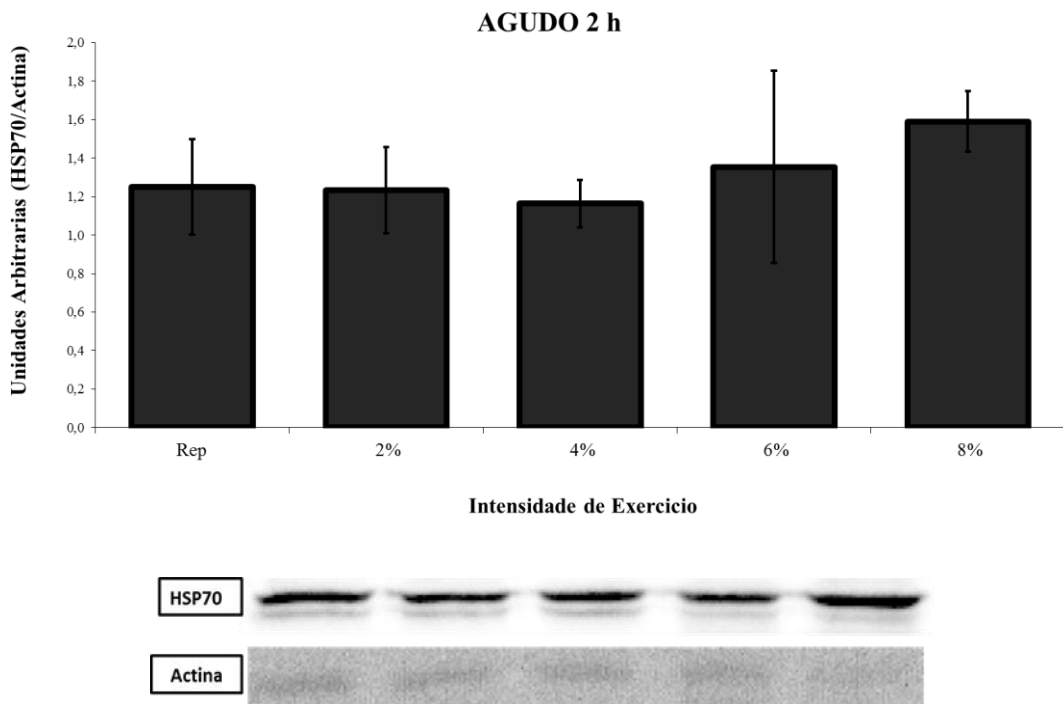


Fig.7. Imunodeteção de HSP70 ($n=4$) no hipotálamo de ratos 2h após sessão aguda de exercício de diferentes intensidades (Rep, 4%, 6% e 8%). Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,531$). Teste da ANOVA de uma via. Dados apresentados como média \pm DP.

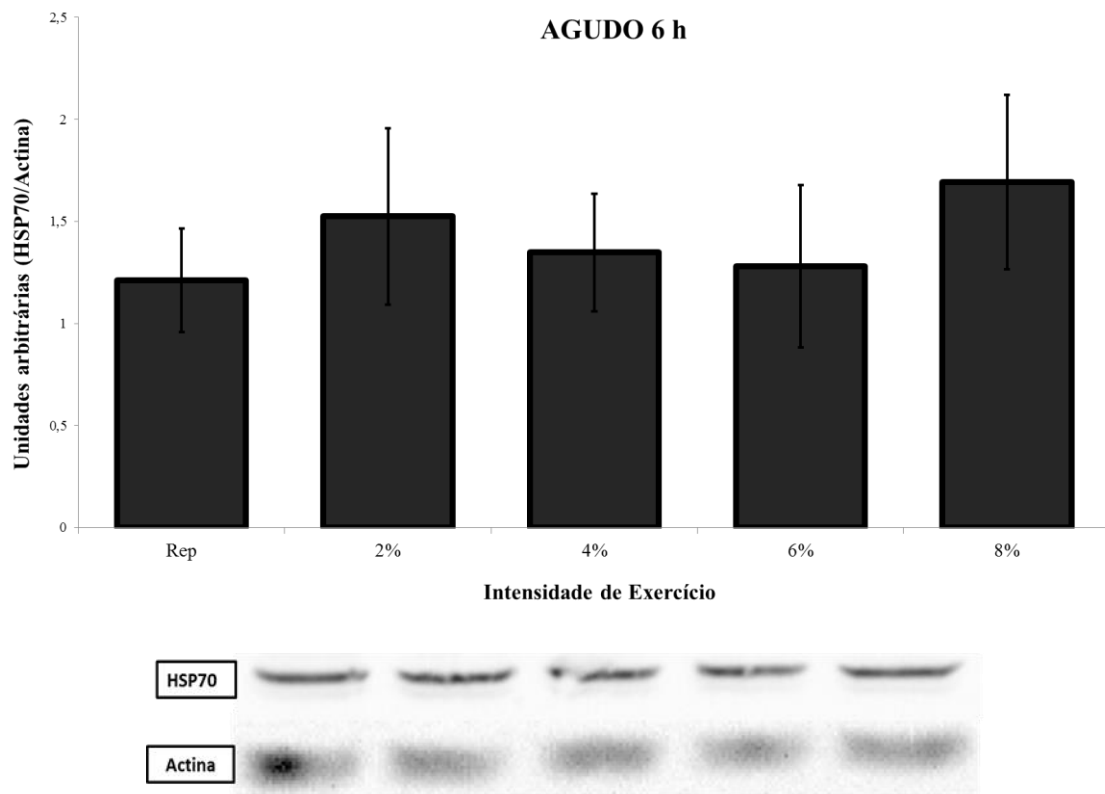


Fig. 8. Imunodeteção de HSP70 ($n=4$) no hipotálamo de ratos 6 h após sessão aguda de exercício de diferentes intensidades (Rep, 4%, 6% e 8%). Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,389$). Teste da ANOVA de uma via. Dados apresentados como média \pm DP.

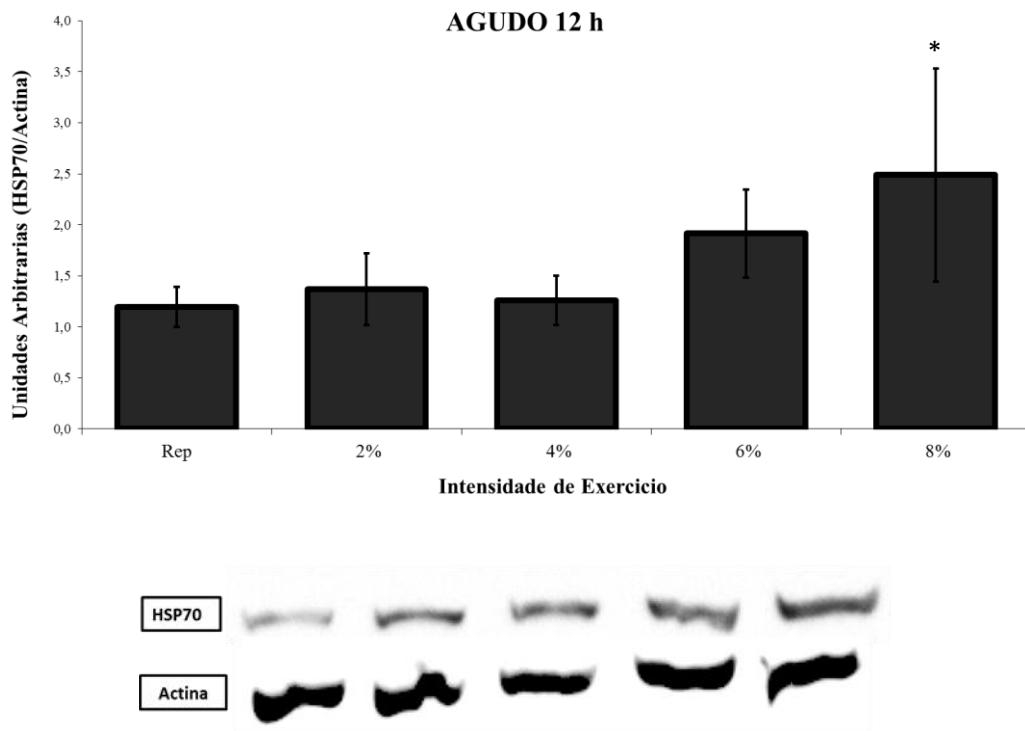


Fig. 9. Imunodeteção de HSP70 ($n=6$) no hipotálamo de ratos 12h após sessão aguda de exercício de diferentes intensidades (Rep, 4%, 6% e 8%). (*) diferença de $p<0,05$ entre o grupo 8% quando comparado com os grupos Rep, 2% e 4%. Teste da ANOVA de uma via, seguido do teste de *post hoc* de LSD. Dados apresentados como média±DP.

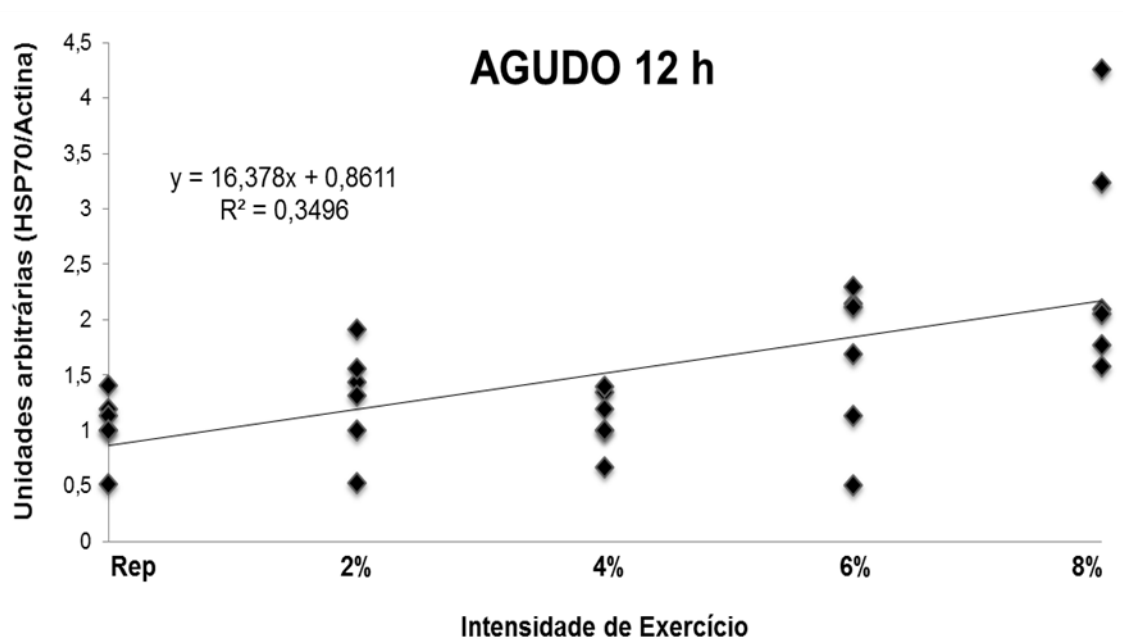


Fig. 10. Correlação entre a imunodeteção de HSP70 no hipotálamo de ratos e a intensidade de exercício 12 h após sessão aguda de exercício de diferentes intensidades (Rep, 4%, 6% e 8%). Há uma correlação positiva entre a expressão da proteína e a intensidade de exercício (correlação de Pearson $p<0,05$).

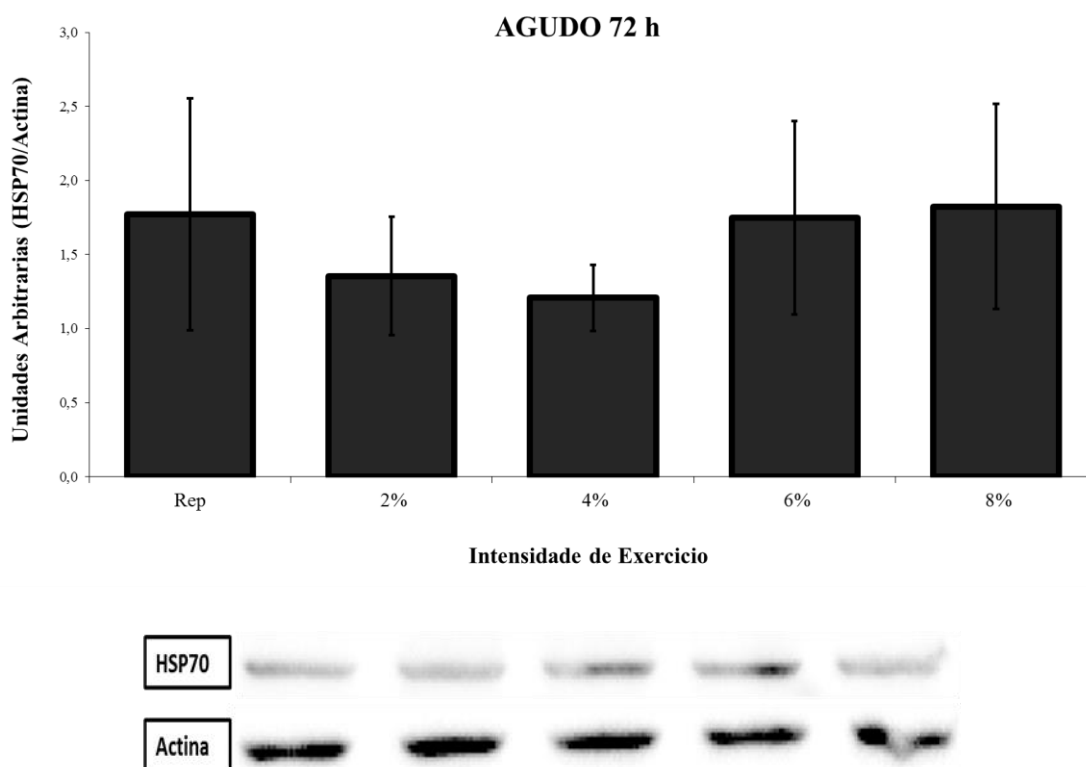


Fig. 11. Imunodeteccção de HSP70 ($n=4$) no hipotálamo de ratos 72h após sessão aguda de exercício de diferentes intensidades (Rep, 4%, 6% e 8%). Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,262$). Teste da ANOVA de uma via. Dados apresentados como média \pm DP.

Sob o treinamento em que a expressão da proteína é avaliada apenas 72 h depois, justamente para evitar o efeito agudo da última sessão, é possível ver uma diferença significativa do grupo exercitado com 8% de carga em comparação aos grupos repouso, 2% e 4%, assim como aconteceu no agudo 12 h (Fig. 12), salientando que estes valores não estão sofrendo influências da última sessão (demonstrados pelo efeito agudo de 72 h, que não sofreu modificações). Isso mostra uma adaptação ao treinamento, que resultou em níveis basais de HSP70 mais elevados no grupo que treinou com maior intensidade. Estes valores da expressão de HSP70 no hipotálamo correlacionam positivamente com o nível de intensidade trabalhada (Fig. 13).

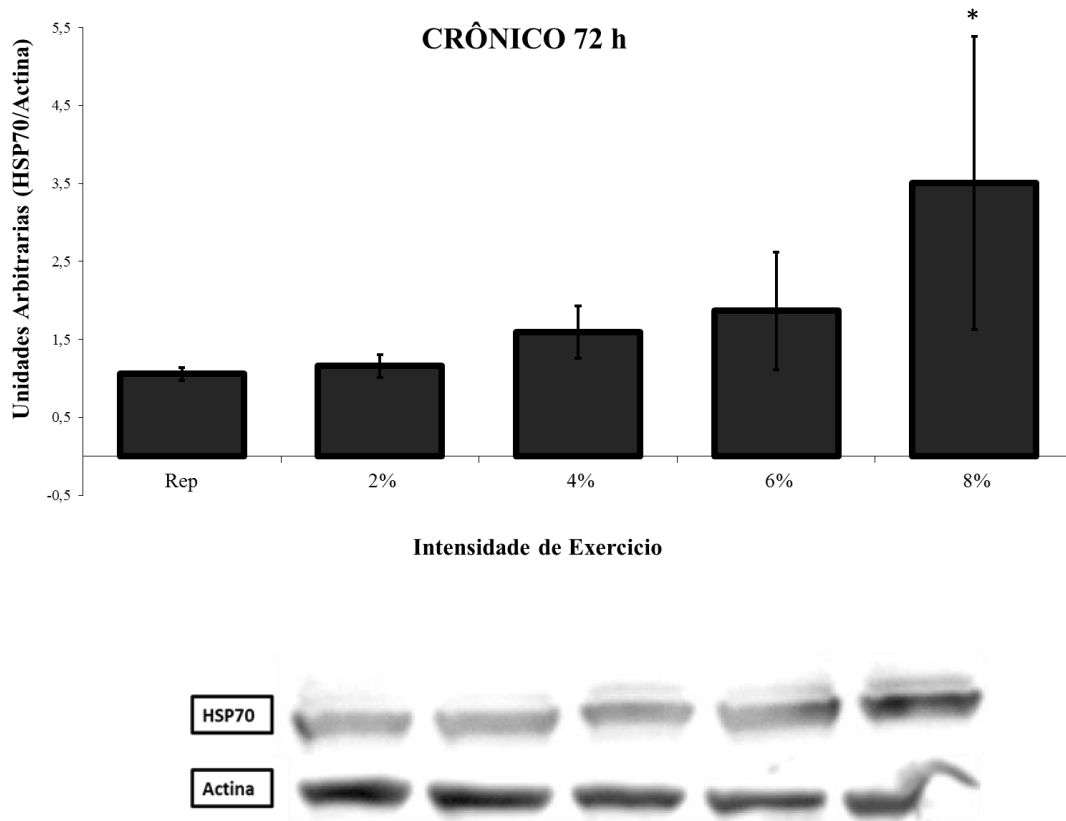
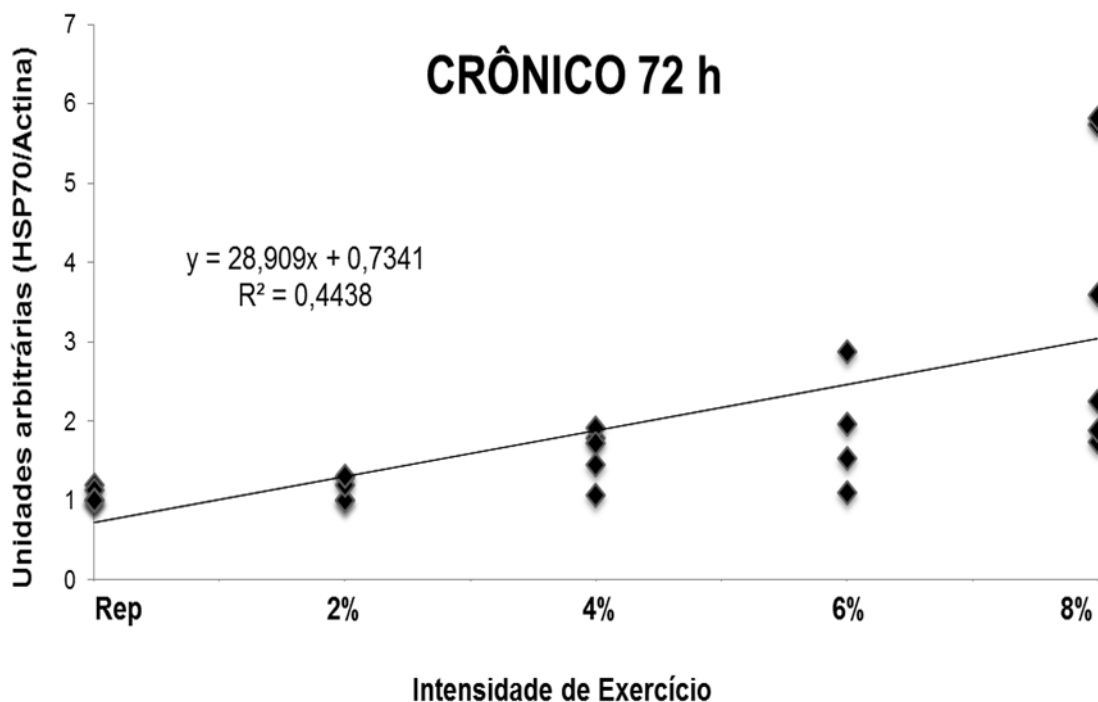


Fig. 12. Imunodeteção de HSP70 ($n=8$) no hipotálamo de ratos treinados durante 8 semanas (5x por semana) 72h após a última sessão de exercício de diferentes intensidades (Rep, 4%, 6% e 8%). (*) diferença de $p<0,05$ entre o grupo 8% quando comparado com os grupos Rep, 2% e 4%. Teste da ANOVA de uma via, seguido do teste de *post hoc* de LSD. Dados apresentados como média \pm DP.



Fi

g. 13. Correlação entre a imunodeteção de HSP70 no hipotálamo de ratos e intensidade de exercício no grupo crônico 72 h após a última sessão de exercício de diferentes intensidades. Há uma correlação positiva entre a expressão da proteína e a intensidade de exercício (correlação de Pearson $p < 0,05$).

4.2 Localização da HSP70 no hipotálamo 12 h após sessão aguda de exercício

Como há diversos núcleos no hipotálamo que desempenham distintas funções, foram realizados cortes seriados em todo o hipotálamo com o intuito de localizar a fonte de aumento de HSP70 nesta estrutura, observado 12 h após uma sessão de exercício de alta intensidade. O Quadro 1 mostra o esquema experimental. Foi realizada marcação dupla com GFAP, para facilitar uma diferenciação dos astrócitos, os quais poderiam ser as células responsáveis por tal indução.

A região do hipotálamo que apresentou elevada marcação, distinta da do repouso, foi justamente a área em torno do terceiro ventrículo, principalmente no núcleo arqueado e na eminência mediana (Fig. 14), estruturas relacionadas à regulação do metabolismo energético e status glicêmico do organismo, além de se constituírem locais onde a barreira hematoencefálica é mais fenestrada, e há grande liberação de hormônios e outras moléculas sinalizadoras para a circulação.

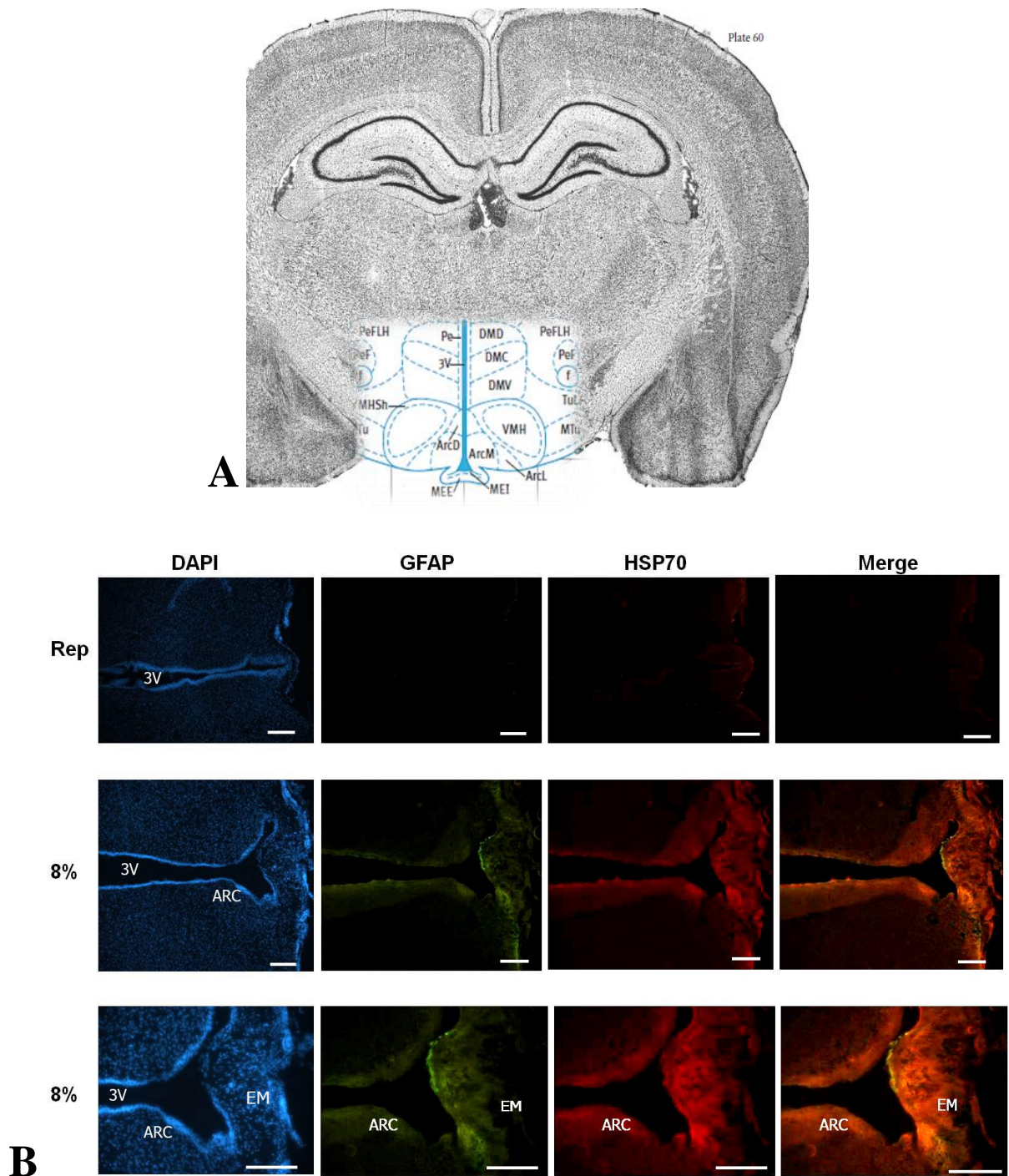


Fig. 14. Localização da HSP70 no hipotálamo. **A.** Ilustração de secção coronal do encéfalo, para orientar a localização do hipotálamo, onde foi encontrada a imunorreacção com anti- HSP70. (Paxinos e Watson, 2009). **B.** Imunofluorescência no hipotálamo de um animal Rep e de um 8%, 12 h após uma sessão de exercício. A imagem inferior mostra o hipotálamo do 8% com um aumento maior. Os cortes foram corados para DAPI (azul), GFAP (verde) e HSP70 (vermelho). Na fusão das imagens (merge) podemos ver a sobreposição de GFAP e HSP70, formando uma coloração alaranjada. ARC, núcleo arqueado; ME, eminência mediana; 3V, terceiro ventrículo. Escala: 200 μ m.

4.3 Efeito do exercício agudo de diferentes intensidades sobre valores de glicemia e laticemia.

Para tanto, os animais passaram por 3 dias de adaptação ao meio aquático e, depois de um dia de intervalo, realizaram uma sessão de exercício, com 4% ou 8% do seu peso corporal de carga atado a base de sua cauda. Um terceiro animal permaneceu em água rasa, condição dita "repouso". Os animais foram mortos imediatamente, 12 h, ou 72 h após a intervenção, onde foi coletado sangue para análise das concentrações de glicose e lactato (Quadro 1). Houve diminuição nos valores de glicemia no animal que se exercitou com intensidade mais elevada (8%), imediatamente após o final do exercício, quando comparado com as outras intensidades, e também quando se compara com os dados de 12 h e 72 h após o início da sessão para a mesma intensidade (8%), mostrando que o aumento da glicemia no tempo "imediatamente" não se mantém nos demais tempos avaliados (Fig. 15). A laticemia do grupo 8% teve um aumento de 5,8x logo ao término da sessão em comparação com o grupo repouso, e de 3,2x quando comparado com o grupo 4%. Os valores de laticemia avaliados 12 h e 72 h após o início da sessão de exercício não diferem entre os grupos (Fig. 16).

Quando correlacionamos as médias de laticemia encontradas nas diferentes intensidades (Rep, 4 e 8%) com a expressão de HSP70 12 h após o final da sessão de exercício, observamos que quanto maior o valor de laticemia, maior foi a expressão de HSP70 no hipotálamo 12 h após o exercício, mostrando uma correlação positiva entre os dois parâmetros (Fig. 17).

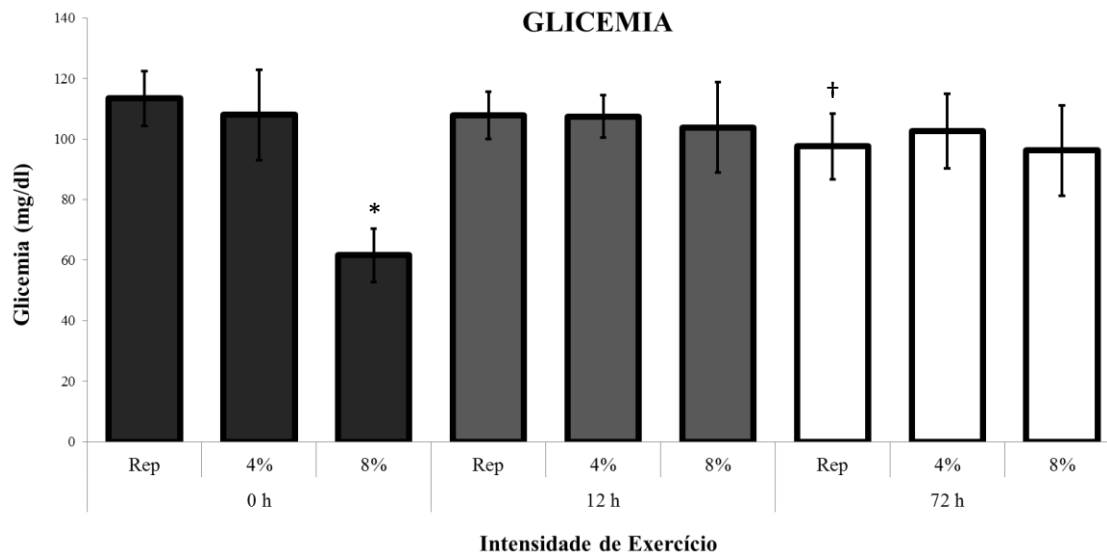


Fig 15. Valores de glicemia imediatamente/0 h ($n=8$), 12 h ($n=8$) e 72 h ($n=5$) após uma sessão de exercício, nas intensidades Rep, 4 e 8% do peso corporal como sobrecarga. (*) diferença significativa ($p<0,05$) entre 8% tempo 0 h e os demais grupos. (†) diferença significativa ($p<0,05$) entre Rep-72 h e Rep-0 h. Teste da ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de LSD. Dados apresentados como média±DP.

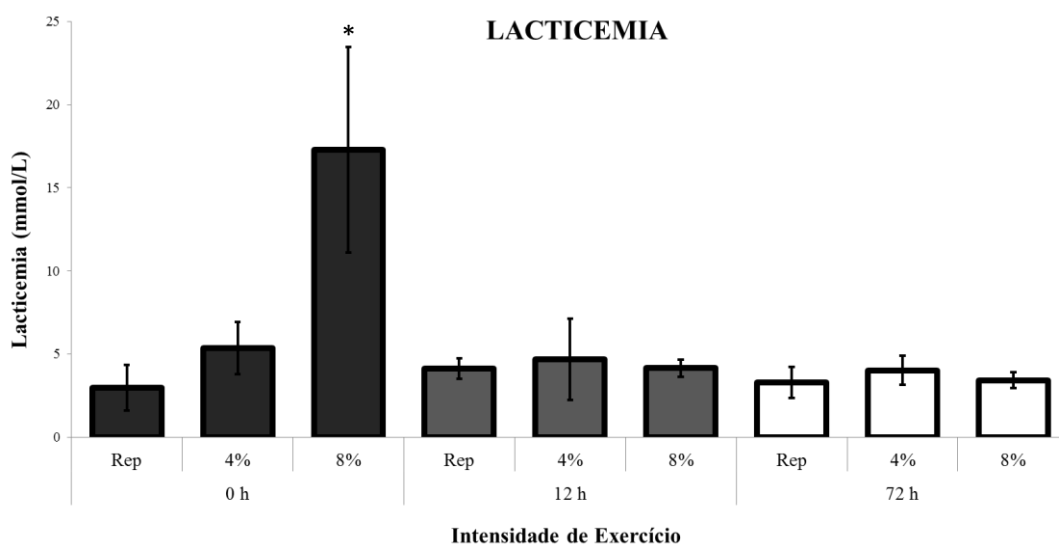


Fig. 16. Valores de lactecmia imediatamente/0 h ($n=8$), 12 h ($n=8$) e 72 h ($n=5$) após uma sessão de exercício, nas intensidades Rep, 4% e 8% do peso corporal como sobrecarga. (*) diferença significativa ($p<0,05$) entre o 8% tempo 0 h e os demais grupos. Teste da ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de LSD. Dados apresentados como média±DP.

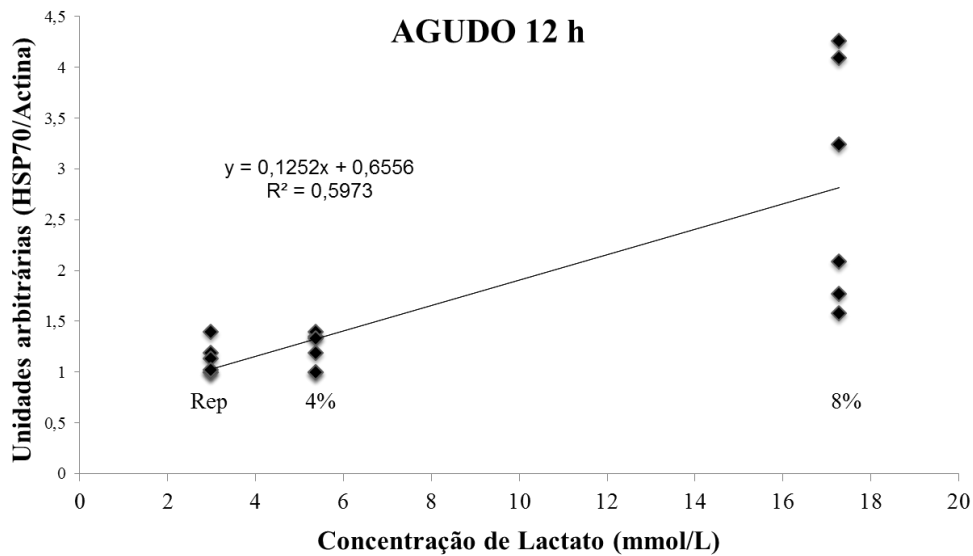
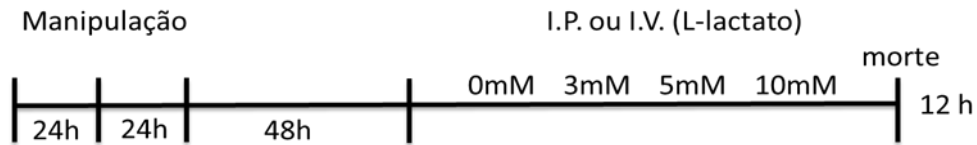


Fig. 17. Correlação entre a média das concentrações de laticemia encontradas imediatamente após uma sessão de exercício nas diferentes intensidades (Rep, 4 e 8%) e a expressão de HSP70 12 h após a sessão de exercício agudo. Há uma correlação positiva entre as concentrações de lactato encontradas nas diferentes intensidades e a expressão de HSP70 12 h após (correlação de Pearson $p < 0,05$).

4. 4 Efeito da injeção de L-lactato sobre a expressão de HSP70 no hipotálamo

Considerando que a expressão de HSP70 está localizada em um dos núcleos hipotalâmicos responsáveis pelo controle do metabolismo e distribuição de energia, elaboramos a hipótese de que o aumento de lactato com o exercício de alta intensidade (com carga de 8% do peso corporal) poderia estar influenciando diretamente a expressão de HSP70, atuando não somente como fonte energética nessa região, mas também como molécula sinalizadora e regulando o metabolismo energético periférico. Para tanto, injetamos L-lactato por via intraperitoneal e também intravenosa, em diferentes concentrações, mimetizando aquelas encontradas no sangue nas diferentes intensidades de exercício, por concentrações finais de 3, 5, 10 e 20 mmol/L, comparando com a condição controle, na qual o animal recebeu apenas PBS (Quadro 2).

QUADRO 2



Quadro 2. Esquema experimental do protocolo realizado para verificar a expressão de HSP70 após injeção de L-lactato. Os animais passaram por 3 dias de manipulação. Depois de 48 h, os animais foram injetados por via intraperitoneal ou intravenosa com diferentes concentrações de L-lactato, e a análise aconteceu 12 h após as injeções.

Não houve diferença na expressão de HSP70 no hipotálamo sob nenhuma das concentrações de lactato, nem mesmo entre as diferentes vias de administração, ou seja, o simples aumento da laticemia, quando isolado dos outros fatores que ocorrem em paralelo durante o exercício, não é capaz de causar alteração na expressão de HSP70 no hipotálamo (Fig. 18).

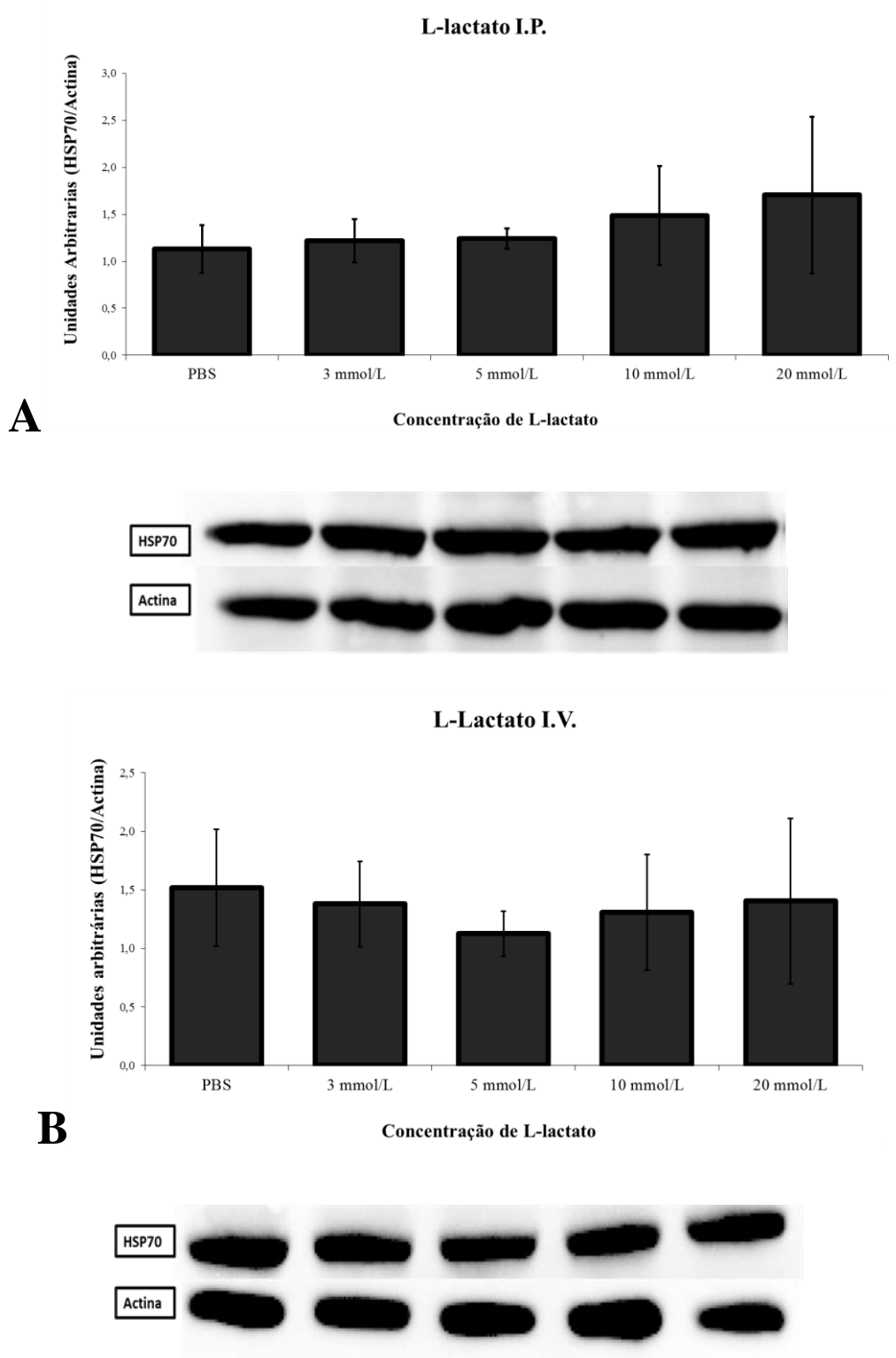
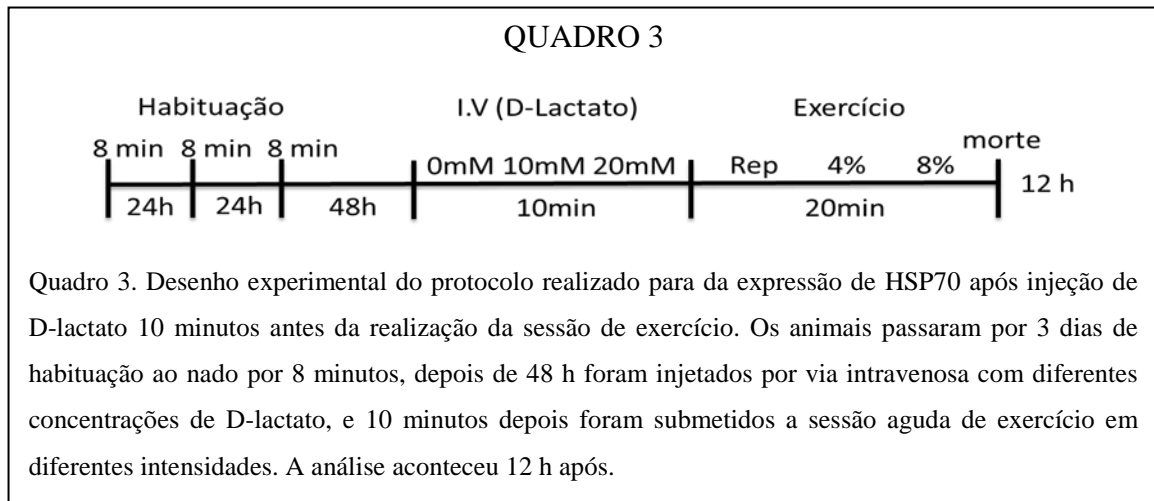


Fig. 18. **A.** Imunodeteccção de HSP70 no hipotálamo de ratos 12 h após injeção intraperitoneal de L-lactato ($n=5$) em diferentes concentrações (3, 5, 10 e 20 mmol/L) e em comparação aos controles (PBS). teste da Anova de uma via seguida de *post hoc* de LSD ($p=0,320$). **B.** Imunodeteccção de HSP70 no hipotálamo de ratos 12 h após injeção intravenosa de L-lactato na veia caudal em diferentes concentrações (PBS, 3, 5, 10 e 20 mmol/L). Teste da ANOVA de uma via ($p=0,850$). Dados apresentados como média \pm DP

4.5 Efeito da competição de D-lactato exógeno com L-lactato sanguíneo nos animais exercitados em diferentes intensidades na expressão de HSP70 no hipotálamo.



O L-lactato não tem efeito sozinho na expressão de HSP70, o que não descarta a possibilidade de que, unido a outro fator que também é modificado com o aumento da intensidade, este possa exercer modificações nesta proteína. Sendo assim, com intuito de reduzir seus efeitos sobre o sistema nervoso central, injetamos, num outro grupo experimental, D-lactato na veia caudal dos animais, 10 minutos antes do início da sessão aguda de exercício, em concentrações proporcionais aos valores encontrados em cada intensidade, ou seja, o animal repouso recebeu apenas PBS, o animal 4% recebeu D-lactato para uma concentração final de 10 mmol/L, e o 8% recebeu 20 mmol/L (Quadro 3). O valor de D-lactato injetado foi o dobro da média encontrada de L-lactato no sangue nessas intensidades, considerando a diferença de afinidade ao transportador, conforme abordado anteriormente.

Podemos verificar que não houve diferenças entre valores de glicemia quando comparamos os grupos injetados com D-lactato aos grupos controles de mesma intensidade que não foram injetados (Fig. 19). O mesmo não ocorreu com os valores de laticemia, pois o animal que nadou com 8% de carga e foi injetado com D-lactato não teve valores tão elevados de lactato quanto o 8% que não foi injetado, mostrando uma ação direta do D-lactato na diminuição da disponibilidade de L-lactato na corrente sanguínea.

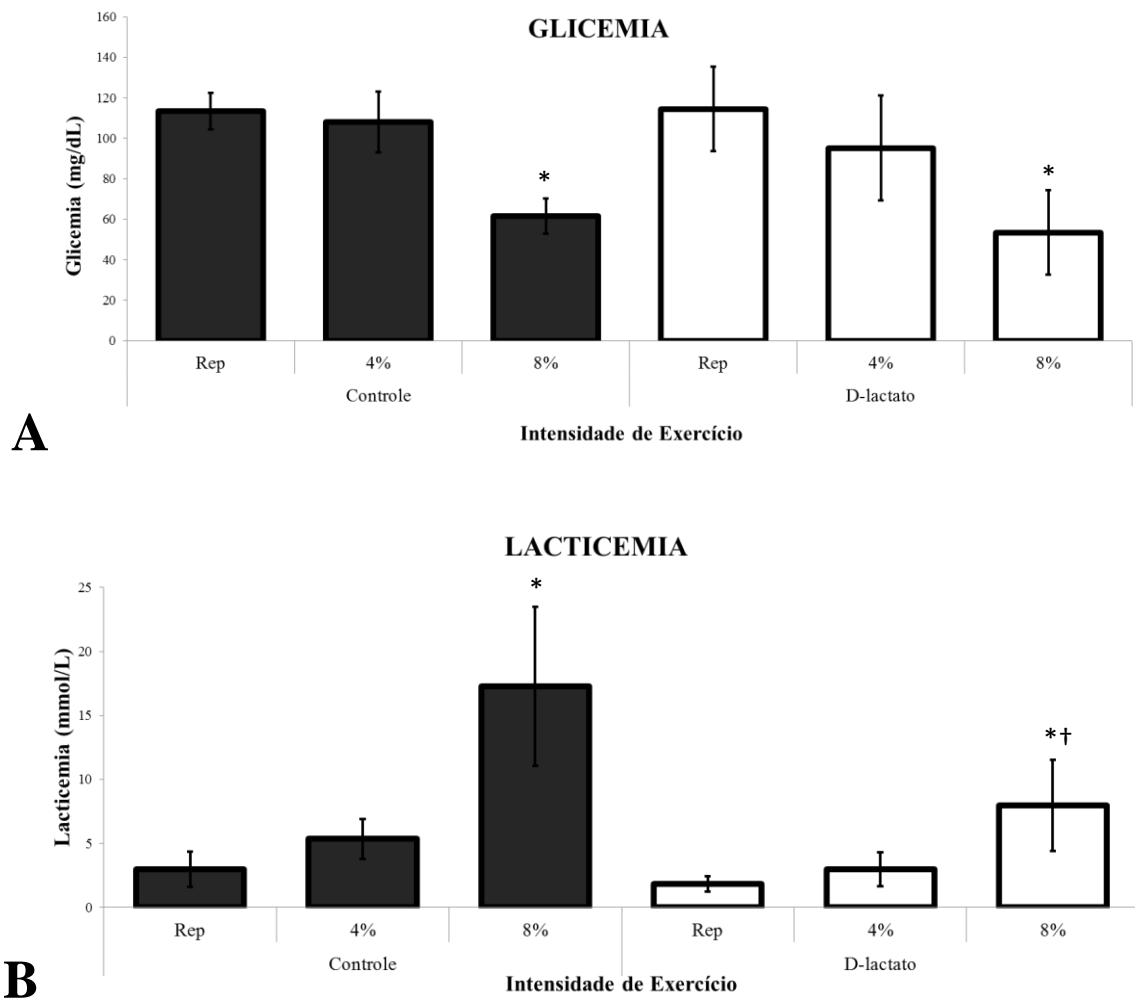


Fig. 19. **A.** Valores de glicemia ($n=5$) imediatamente após a sessão de exercício agudo, em diferentes intensidades (Rep, 4 e 8%), nos grupos que não receberam nenhuma injeção e nos que receberam D-lactato intravenoso (0, 10 e 20 mmol/L). **B.** Valores de lacticemia imediatamente após a sessão de exercício agudo, em diferentes intensidades (Rep, 4 e 8%), nos grupos que não receberam nenhuma injeção e nos que receberam D-lactato intravenoso (0, 10 e 20 mmol/L. (*) diferença significativa ($p<0,05$) comparado com o Rep e 4% do seu grupo. (†) diferença significativa ($p<0,05$) quando comparado com o grupo 8% controle. Teste da ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de LSD. Dados apresentados como média \pm DP

Quando avaliamos a expressão de HSP70 nesses animais, 12 h após o final da sessão de exercício, não encontramos mais diferenças na expressão desta, quando comparamos com os grupos “repouso” e o “4%”, mostrando que a injeção de D-lactato foi capaz de bloquear, ao menos parcialmente, o efeito do exercício sobre a expressão de HSP70 no hipotálamo (Fig. 20).

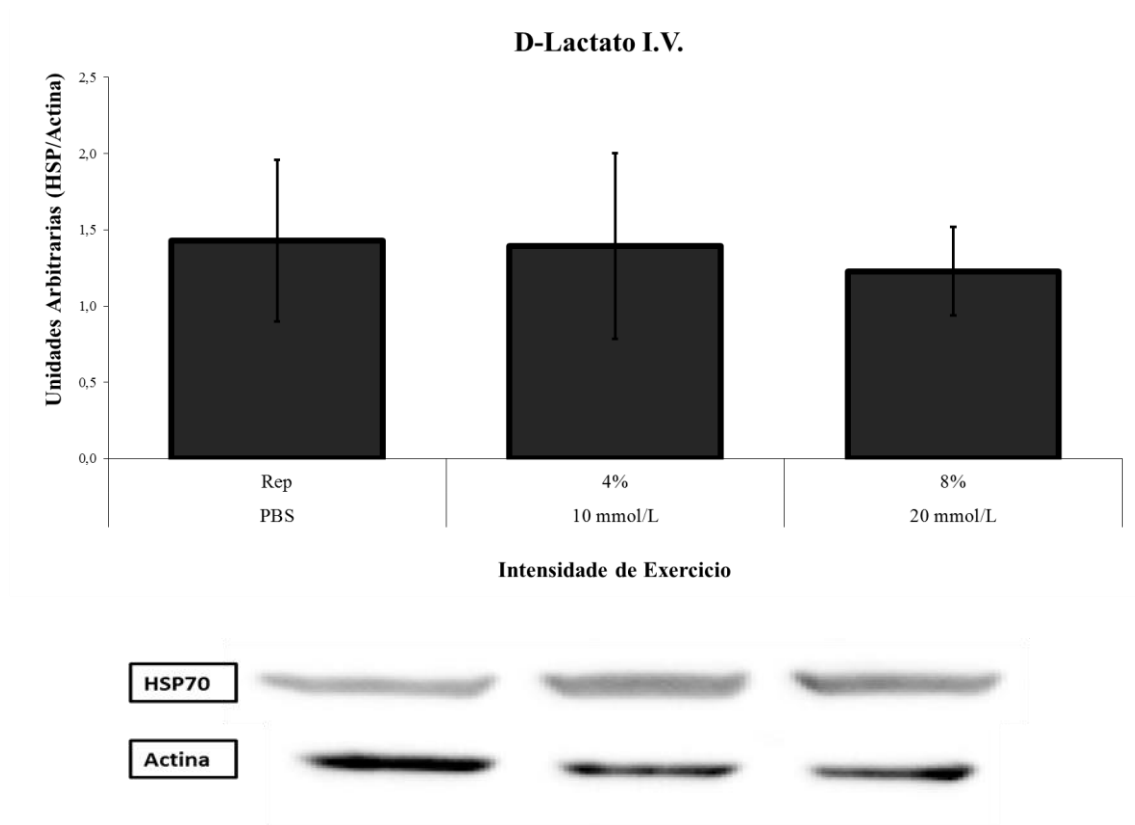
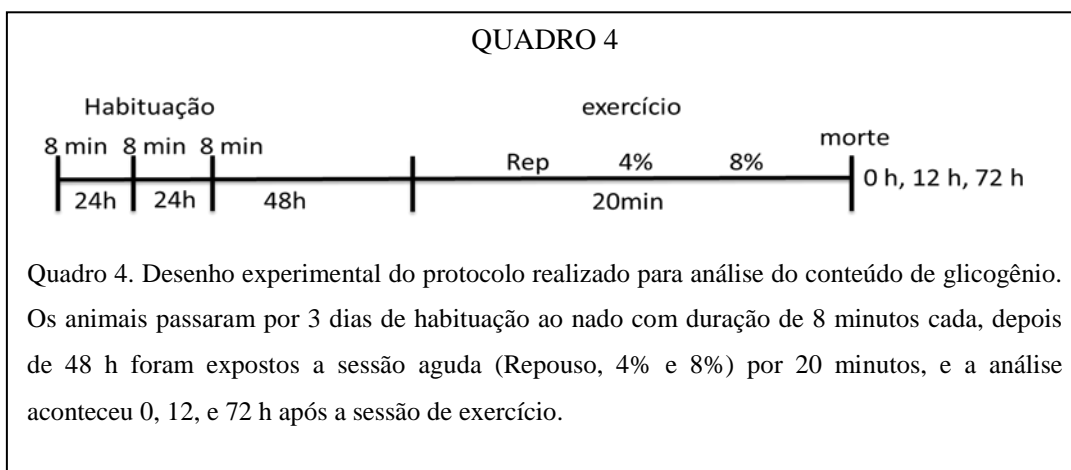


Fig. 20. Imunodeteção de HSP70 ($n=5$) no hipotálamo 12 h após sessão aguda de exercício em diferentes intensidades (Rep, 4 e 8%), em animais que foram injetados com D-lactato intravenoso 10 minutos antes do início da sessão, em diferentes concentrações (0, 10 e 20 mmol/L). Não houve diferença entre os grupos ($p=0,796$). Teste da ANOVA de uma via. Dados apresentados como média \pm DP.

4.6 Conteúdo hipotalâmico de glicogênio após exercício agudo de diferentes intensidades.

Avaliamos o conteúdo de glicogênio presente no hipotálamo dos animais que realizaram uma sessão aguda de exercício em diferentes intensidades, já que esta é uma forma de armazenamento de energia presente nos astrócitos do sistema nervoso central. Os tempos utilizados nesta análise foram: 0 h, 12 h e 72 h (Quadro 4).



Os valores de glicogênio presentes no hipotálamo do grupo que se exercitou a 8% foram mais elevados quando comparado com o repouso e 4%, tanto imediatamente, quanto 12 h após o término da sessão. Esses valores já não apresentavam mais diferença quando analisados 72 h depois (Fig. 21).

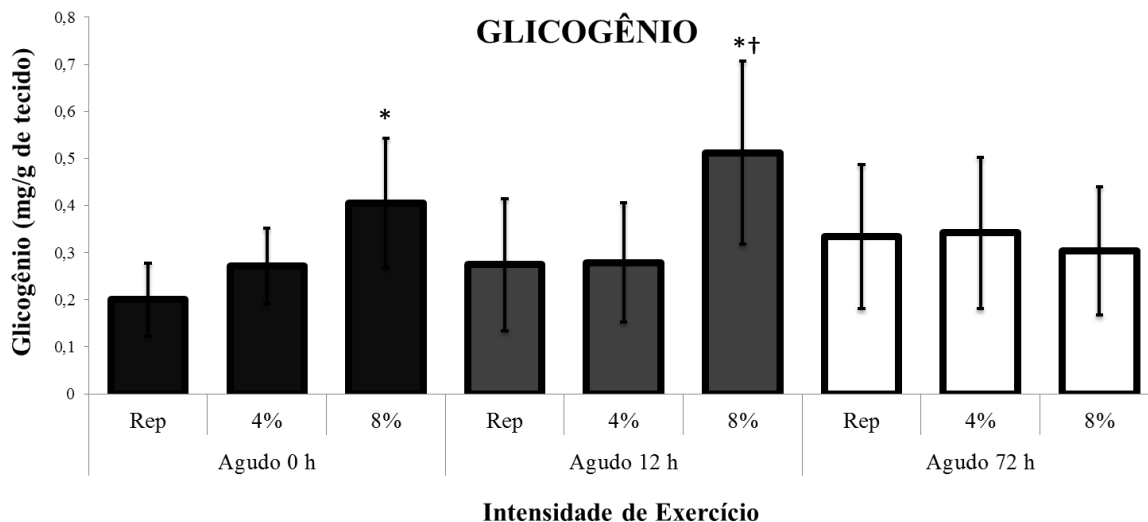
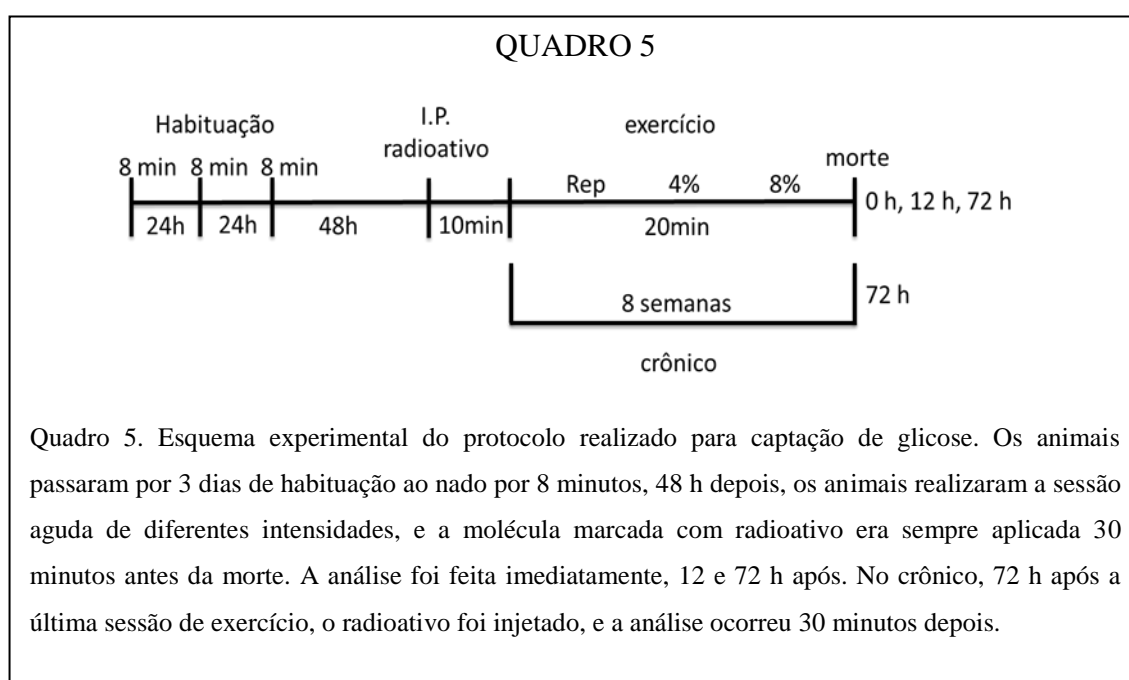


Fig. 21. Conteúdo de glicogênio no hipotálamo de ratos sedentários imediatamente ($n=10$), 12 h ($n=10$) e 72 h ($n=8$) após a sessão de exercício de diferentes intensidades (Rep, 4% e 8%). (*) diferença ($p<0,05$) entre o Rep e 4% de seu grupo. (†) diferente ($p<0,05$) do 8% 72 h. Teste da ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de LSD. Dados apresentados como média±DP.

4. 7 Captação de [³H] 2-desóxi glicose pelo hipotálamo após uma sessão de exercício e treinamento de diferentes intensidades.

Para analisarmos a demanda energética do tecido em questão, utilizando nosso protocolo de exercício de diferentes intensidades, avaliamos a captação de 2-desóxi glicose triciada pelo hipotálamo, em diferentes tempos - imediatamente, 12 h e 72 h após a sessão aguda e também 72 h após a última sessão de exercício no grupo treinado - para avaliar possíveis mudanças no metabolismo energético encefálico basal (Quadro 5).



Imediatamente após o exercício observa-se uma diferença na captação, quando comparamos o grupo 8% com o repouso, mostrando uma diminuição da captação de glicose, com o incremento da intensidade. Essa diferença prosseguiu até 12 h após o final da sessão aguda de exercício e voltou a valores basais 72 h após a última sessão (Fig. 22). Quando analisamos os grupos treinados, mesmo 72 h após a última sessão, ainda há uma captação de glicose reduzida quando comparado com o repouso, que difere do 8% agudo 72 h, mostrando assim, que o grupo que treinou por 8 semanas em alta intensidade, utiliza menos glicose do que quando em repouso.

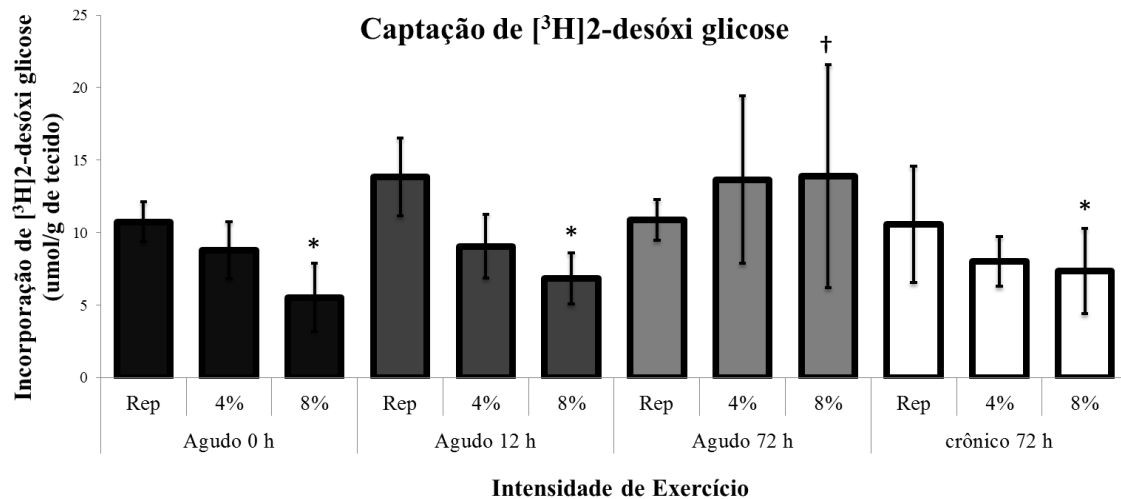
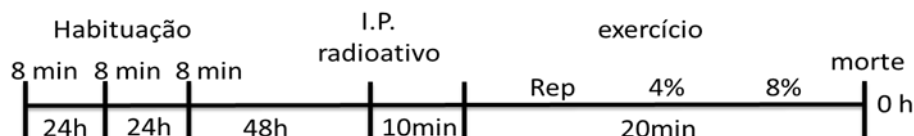


Fig. 22. Captação de $[^3\text{H}]2$ -desóxi glicose pelo hipotálamo de ratos sedentários imediatamente ($n=6$), 12 h ($n=4$) e 72 h ($n=6$) após uma sessão de exercício de diferentes intensidades (Rep, 4% e 8%) e de ratos submetidos ao treinamento ($n=6$), 72 h após a última sessão de exercício de diferentes intensidades (Rep, 4% e 8%). (*) diferente ($p<0,05$) do Rep do seu grupo. (†) diferente ($p<0,05$) de todos outros 8% (0 h, 12 h e crônico). Teste da ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de LSD. Dados apresentados como média \pm DP.

4. 8 Captação de $[^{14}\text{C}]$ ácido láctico por diferentes tecidos após uma sessão de exercício de diferentes intensidades.

Como a captação de glicose se mostrou diminuída no grupo de maior intensidade, buscou-se avaliar, então, a captação de outra molécula candidata a ter sua captação aumentada com o exercício, e que pudesse ser utilizada como fonte energética, para suprir a diminuição na disponibilidade de glicose para o hipotálamo. Considerou-se que seria o lactato, pois além de estar mais disponível em altas concentrações no sangue, é facilmente captado e utilizado pelos neurônios. Além do hipotálamo, foram analisados também outros tecidos que utilizam essa molécula em grandes quantidades, o fígado e o coração, para fins comparativos. Os animais foram mortos imediatamente após uma sessão aguda de exercício em diferentes intensidades (Quadro 6).

QUADRO 6



Quadro 6. Esquema experimental do protocolo realizado para captação de lactato. Os animais passaram por 3 dias habituação ao nado por 8 minutos, 48 h depois, os animais realizaram a sessão aguda de diferentes intensidades, e a molécula marcada com radioativo foi aplicada 10 minutos antes do início do exercício. A análise aconteceu imediatamente após a sessão.

Verificou-se um aumento de 6,4x na captação de lactato pelo hipotálamo do animal que se exercitou a 8% quando comparado com o repouso, e de 4,5x quando comparado com o exercitado com carga de 4%. O fígado do animal que se exercitou a 8% de carga teve um aumento na captação de 9,2x quando comparado com o repouso e de 4,2x quando comparado com o 4%. Da mesma forma, o coração de animal com 8% de carga teve um aumento na captação de lactato de 5,3x quando comparado com o repouso e de 3,2 quando comparado com o 4%. Os valores de captação do fígado de animal com 8% de carga foram maiores do que os do hipotálamo e do coração e esses 2 últimos não diferiram entre si (Fig. 23).

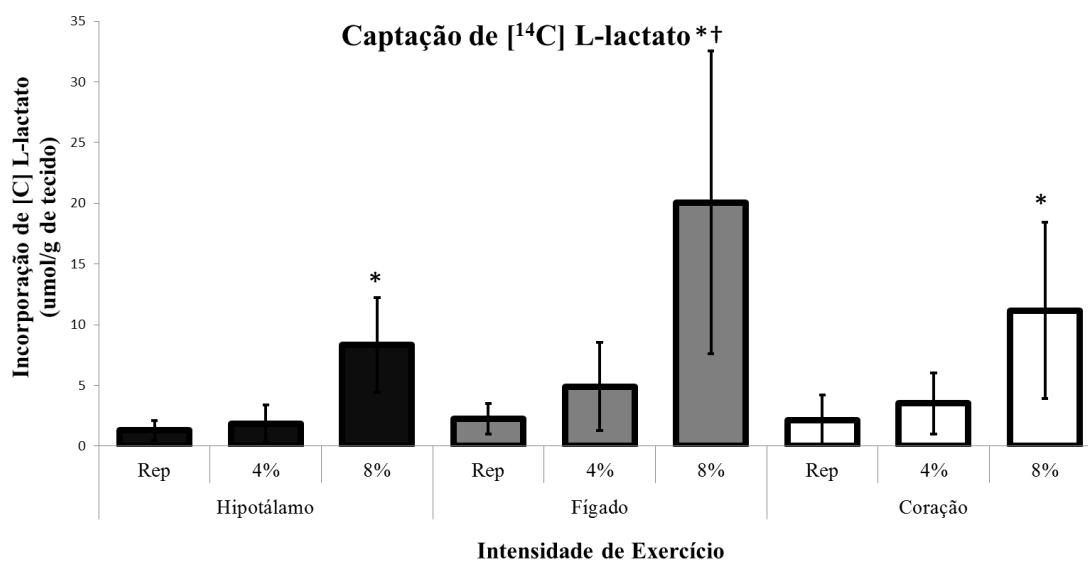


Fig. 23. Captação de $[^{14}\text{C}]$ lactato pelo hipotálamo, fígado e coração de ratos sedentários imediatamente ($n=6$) após uma sessão de exercício (Rep, 4% e 8%). (*) diferença ($p<0,05$) em relação ao repouso e a 4% do seu grupo. (*†) Difere ($p<0,05$) do hipotálamo e do coração 8%. Teste da ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de LSD. Dados apresentados como média \pm DP.

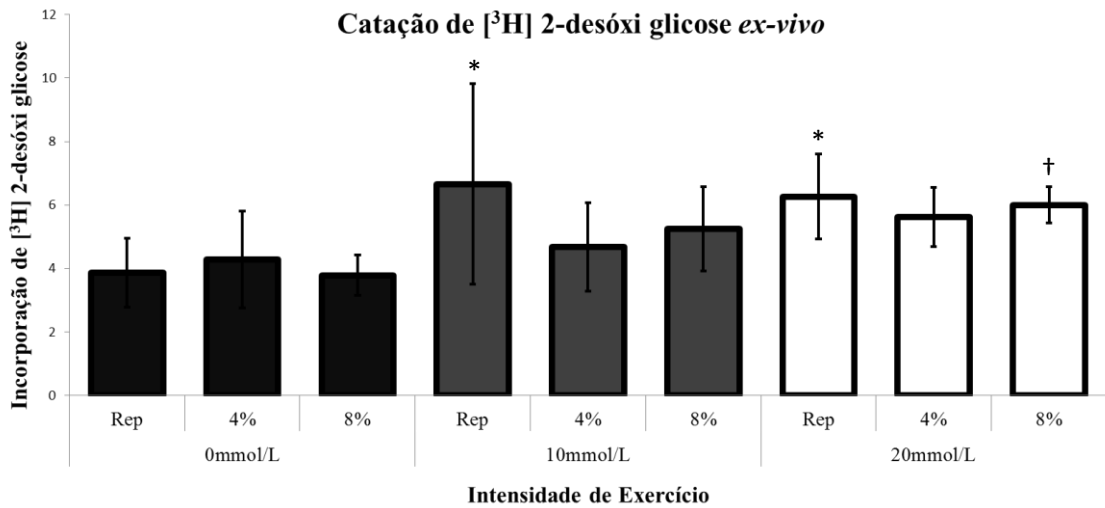


Fig. 24. Captação de [³H]2-desóxi glicose pelo hipotálamo extraído de ratos sedentários imediatamente ($n=6$) após uma sessão de exercício (Rep, 4% e 8%) e incubados por 90 min com diferentes concentrações de L-lactato (0, 10 e 20 mmol/L). (*) Difere ($p<0,05$) do grupo Rep 0 mmol/L. (†) Difere ($p<0,05$) do grupo 8% 0 mmol/L. Teste da ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de LSD. Dados apresentados como média±DP.

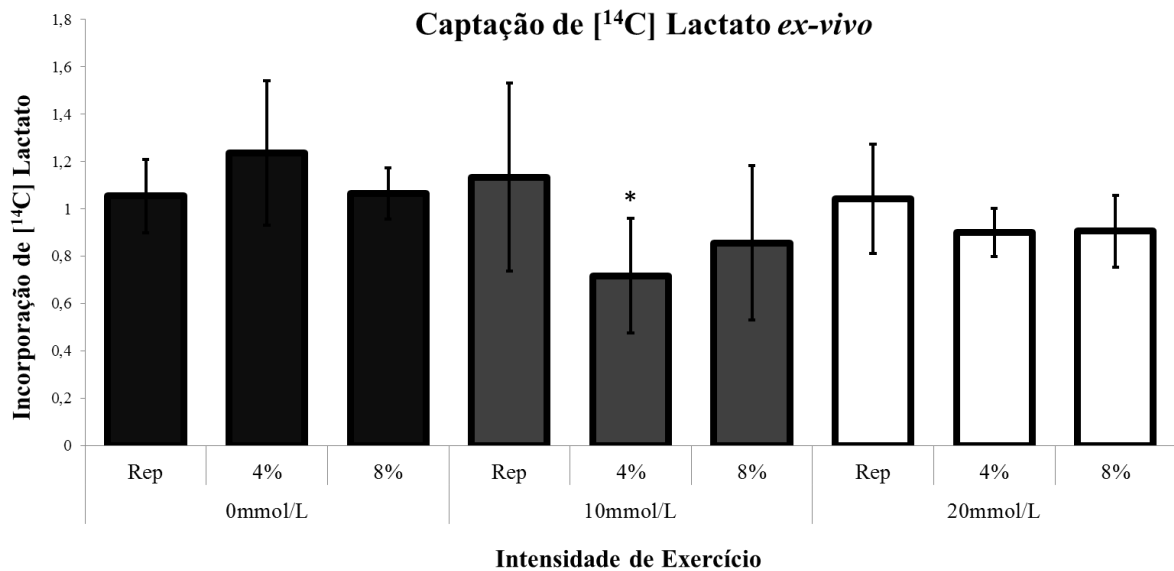
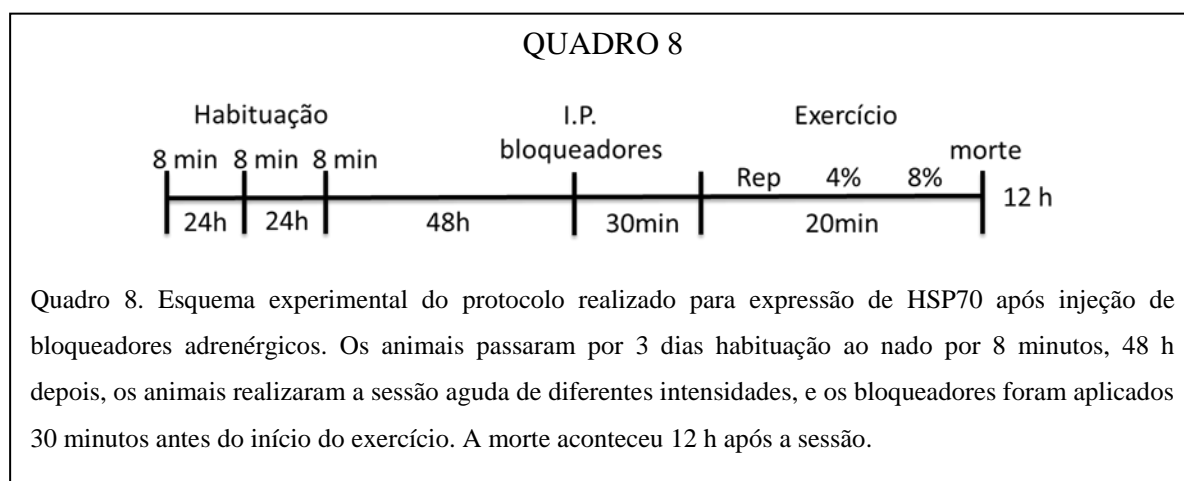


Fig. 25. Captação de [¹⁴C] lactato pelo hipotálamo extraído de ratos sedentários imediatamente ($n=6$) após uma sessão de exercício (Rep, 4% e 8%) e incubados por 90 minutos com diferentes concentrações de L-lactato (0, 10 e 20 mmol/L). (*) Difere ($p<0,05$) do grupo 10 mmol/L. Teste da ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de LSD. Dados apresentados como média±DP.

4.10 Influência da via alfa adrenérgica na expressão de HSP70 induzida pelo exercício agudo de diferentes intensidades.

Para verificar se a via α -adrenérgica poderia estar influenciando o aumento da expressão de HSP70 induzida pelo exercício, utilizamos bloqueadores dos receptores α_1 , α_2 e um bloqueio dos 2 receptores ao mesmo tempo, 30 minutos antes do início da sessão aguda de exercício, nas 3 diferentes intensidades. Os animais foram mortos 12 h após, e o hipotálamo foi processado para Western Blot (Quadro 8).



Observa-se somente diminuição da glicemia com o aumento da intensidade no grupo que recebeu PBS e no grupo que recebeu bloqueio do receptor α_2 , pois no grupo que recebeu bloqueador α_1 e bloqueio duplo não há diferenças nos níveis glicêmicos entre as diferentes intensidades. Os animais que se exercitaram com 8% de carga e foram bloqueados com α_1 e duplo diferem dos animais 8% que receberam PBS e bloqueio do receptor α_2 , mostrando que a diminuição da glicose nos animais com 8% de carga dependente do receptor α_1 (Fig. 26). Além disso, o grupo 4% com bloqueio duplo tem uma elevação da glicemia quando comparado com o PBS da mesma intensidade. Após 12 h, não se observam diferenças entre os grupos experimentais.

Todos os grupos tiveram valores mais elevados de laticemia imediatamente após a sessão aguda de exercício, nos animais que se exercitaram com 8% de carga quando comparado com o repouso e 4%, o que não aconteceu 12 h após o final da sessão. Somente o grupo com bloqueio α_1 apresentou diferenças no lactato entre as intensidades a 12 h após o

exercício, no qual o grupo 8% mostrou valores mais elevados quando comparado com o 4% (Fig. 27).

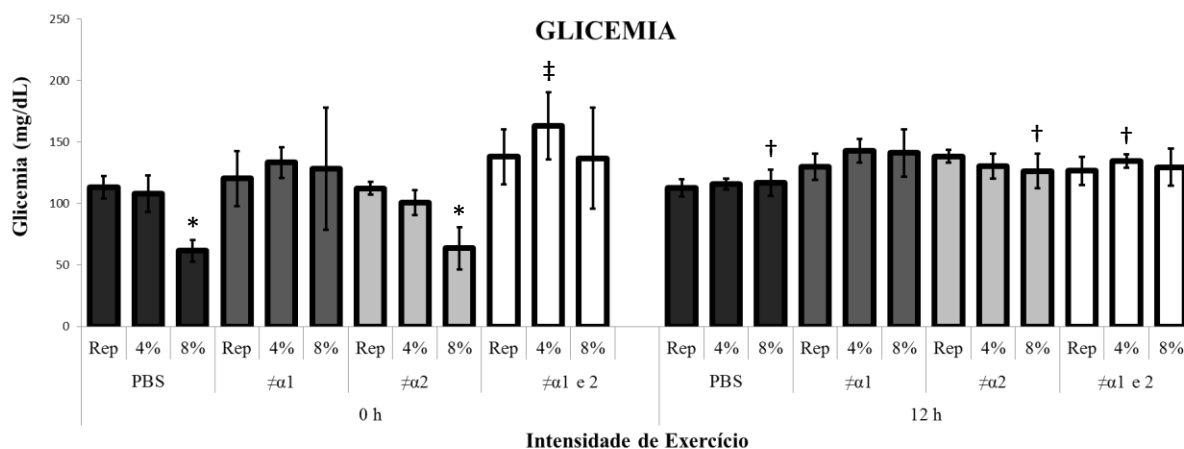


Fig. 26. Glicemia 12 h após uma sessão aguda de exercício de diferentes intensidades (Rep, 4 e 8%), onde os animais receberam injeção intraperitoneal 30 minutos antes do início da sessão [PBS ($n=6$), bloqueador alfa 1 ($n=4$), bloqueador alfa 2 ($n=3$) e os dois bloqueadores ao mesmo tempo ($n=4$)]. (*) Difere ($p<0,05$) das outras intensidades e do 8% α_1 e α_{1e2} . (‡) Difere ($p<0,05$) do PBS e α_2 da mesma intensidade. (†) Difere ($p<0,05$) do mesmo grupo no tempo 0 h. Teste da ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de LSD. Dados apresentados como média±DP. α_1 , bloqueador do receptor alfa 1; α_2 , bloqueador do receptor alfa 2; α_{1e2} , bloqueadores dos receptores alfa 1 e 2.

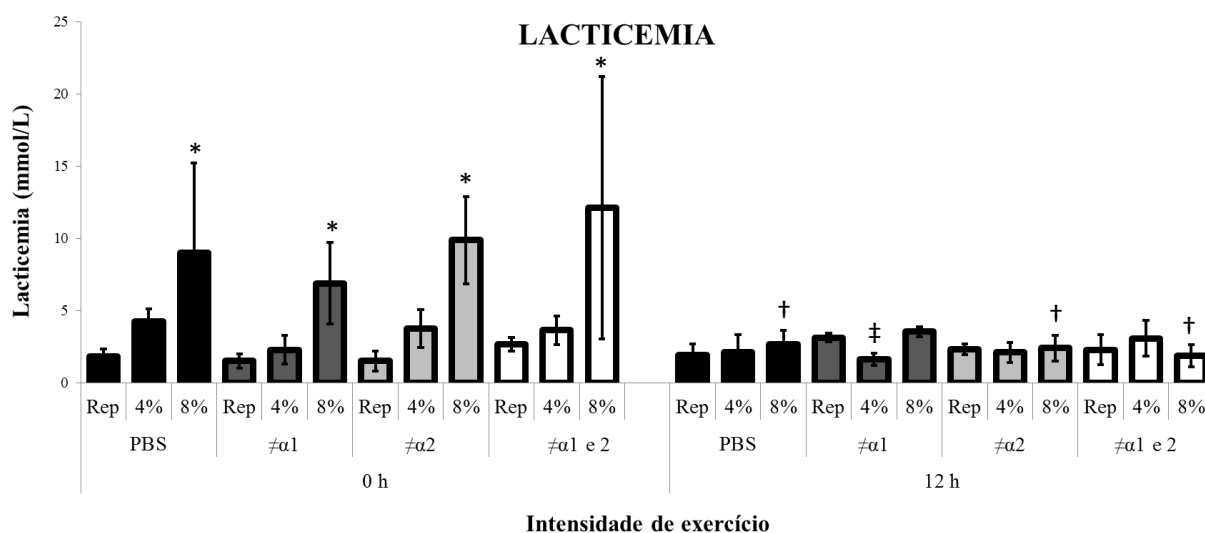


Fig. 27. Lacticemia 12 h após uma sessão aguda de exercício de diferentes intensidades (Rep, 4 e 8%), onde os animais receberam injeção intraperitoneal 30 minutos antes do início da sessão [PBS ($n=6$), bloqueador alfa 1 ($n=4$), bloqueador alfa 2 ($n=3$) e os dois bloqueadores ao mesmo tempo ($n=4$)]. (*) diferente ($p<0,05$) das outras intensidades. (†) Difere ($p<0,05$) do mesmo grupo no tempo 0 h. (‡) Difere ($p<0,05$) do seu grupo 4%. Teste da

ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de LSD. Dados apresentados como média±DP. $\neq\alpha_1$, bloqueador do receptor alfa 1; $\neq\alpha_2$, bloqueador do receptor alfa 2; $\neq\alpha_1\text{e}2$, bloqueadores dos receptores alfa 1 e 2.

Na expressão de HSP70, verificamos um efeito direto de todos os bloqueadores utilizados, pois os animais que permaneceram em repouso e receberam qualquer um dos bloqueios, apresentaram níveis significativamente mais elevados quando comparados com o repouso PBS (Fig. 28). Ao contrário, somente nos animais com 8% de carga e com bloqueio do receptor α_1 não diferiram do grupo repouso com PBS, além de apresentar valores mais baixos do que seu repouso que teve o receptor α_1 bloqueado, o que indica a necessidade da via α_1 adrenérgica para que haja aumento na expressão de HSP70 induzida pelo exercício de alta intensidade no hipotálamo, pois o bloqueio aboliu o aumento encontrado anteriormente.

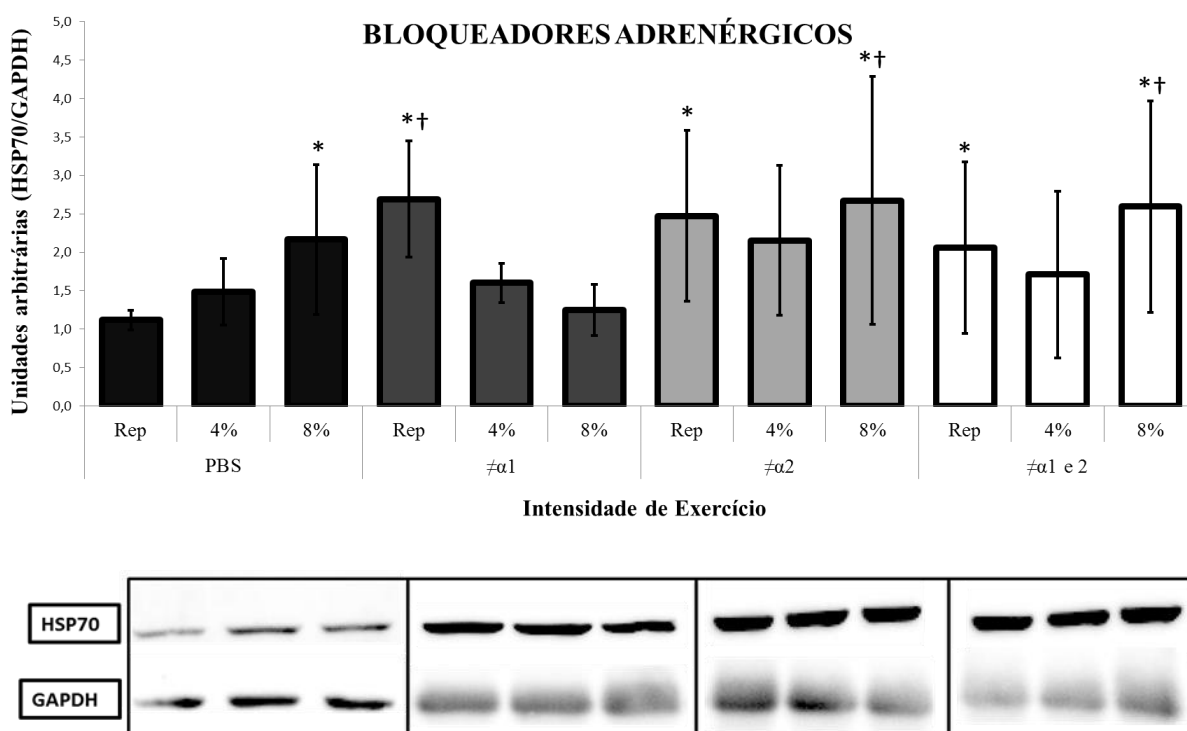


Fig. 28. Imunodeteção de HSP70 12 h após uma sessão aguda de exercício de diferentes intensidades (Rep, 4 e 8%), onde os animais receberam injeção intraperitoneal 30 minutos antes do início da sessão [PBS ($n=6$), bloqueador alfa 1 ($n=4$), bloqueador alfa 2 ($n=3$) e os dois bloqueadores ao mesmo tempo ($n=4$)]. (*) Difere ($p<0,05$) do Rep PBS. (†) Difere ($p<0,05$) do 8% α_1 . Teste da ANOVA de duas vias, seguido de *post hoc* de LSD. Dados apresentados como média±DP. $\neq\alpha_1$, bloqueador do receptor alfa 1; $\neq\alpha_2$, bloqueador do receptor alfa 2; $\neq\alpha_1\text{e}2$, bloqueadores dos receptores alfa 1 e 2.

5. DISCUSSÃO

O gene que codifica a HSP70 nos mamíferos possui uma homologia de 50% com o de *Escherichia coli*, demonstrando assim sua importância ao longo da evolução. Estima-se que as proteínas de choque térmico tenham surgido há cerca de 1,5 bilhão de anos (Boorstein *et al.*, 1994; Febbraio *et al.*, 2004). Sua expressão é observada em todo tipo celular, e no sistema nervoso central não é diferente. Primeiramente porque neurônios dependem de extensiva síntese proteica, o que demanda chaperonas moleculares, como as proteínas da família da HSP70. Além disso, porque os neurônios são células extremamente sensíveis a qualquer tipo de estresse, necessitando de complexos mecanismos citoprotetores (Ohtsuka e Suzuki, 2000; Lancaster, 2006). Já foi demonstrado que a HSP70, seja por indução via choque térmico, ou por superexpressão via vetor viral, é capaz de proteger células do sistema nervoso contra insultos tais como elevados níveis de peróxido de hidrogênio, privação de glicose e oxigênio e toxicidade glutamatérgica, mas esta varia de acordo com o local e tipo celular afetado (Lee *et al.*, 2001; Belay e Brown, 2006). Esta proteína é fundamental para sobrevivência celular (Robinson *et al.*, 2005).

Como já foi descrito anteriormente, diversos tipos de estresse são capazes de induzir HSP70, dentre eles, o exercício físico. Diversos tecidos respondem aumentando a expressão de HSP70 após a realização de exercício físico agudo e treinamento, como o músculo esquelético (Liu *et al.*, 2004; Febbraio e Koukoulas, 2000) e cardíaco (Melling *et al.*, 2007), fígado, células do sistema imunitário e do sistema nervoso central (Campisi *et al.* 2003; Hayes *et al.*, 2008; Liebelt *et al.*, 2010). Normalmente, este aumento tem sido associado à elevação da temperatura corporal (Skidmore *et al.*, 1995), fato que foi descartado em nosso estudo, pois os animais realizaram exercício de natação, acarretando em perda de calor corporal para água, inclusive reduzindo os valores de temperatura retal. Já foi avaliado também o efeito da hipotermia (30°C) sobre a expressão desta proteína, após isquemia global, e esta não foi capaz de induzir HSP70 em nenhuma região encefálica avaliada em gerbilos, pois mesmo nos controles, nos quais não houve mudanças na temperatura após isquemia, foi verificado aumento da expressão de HSP70 em diversas regiões encefálicas, mostrando que a redução da temperatura não está associada a um aumento da expressão de HSP70 (Kumar *et al.*, 1995). Sendo assim, as diferenças na expressão de HSP70 que encontramos também não seriam justificadas pelas reduções na temperatura corporal.

Ao avaliarmos a expressão de HSP70 após sessão aguda de exercício de natação em diferentes intensidades no hipotálamo, verificamos um aumento significativo no grupo que se exercitou em maior intensidade (8%), quando comparado com o repouso, 2 e 4%, apenas 12 h após o término da sessão. Ainda não havia sido demonstrado efeito somente do exercício agudo sobre a expressão de HSP70 no hipotálamo, apenas quando realizado treinamento de 3 semanas em esteira, ou associado a outros fatores que elevassem a temperatura corporal. Entretanto, este aumento já foi comprovado em outras estruturas encefálicas induzida pelo exercício, como córtex frontal, hipocampo, estriado e complexo dorsal do vago (Walters *et al.*, 1998; Campisi *et al.*, 2003). Quais seriam então as diferenças das condições estabelecidas no nosso estudo, que poderiam ter influenciado a expressão de HSP70? Em primeiro lugar, devemos ressaltar a curva temporal feita para analisar a proteína nos tempos 0, 2, 6, 12 e 72 h após o exercício. Em estudos anteriores a avaliação foi feita 2h (Campisi *et al.*, 2003) ou 6 h (Walters *et al.*, 1998) após exercício em esteira. Além disso, o nosso protocolo diferia não somente no modelo, natação ao invés de esteira, mas também nas variáveis de exercício, onde utilizamos curta duração, e 5 diferentes intensidades, ao contrário do comumente utilizado, ou seja, com maior volume (tempo) e moderada intensidade (em média 60% do $VO_{2máx}$). Comprovamos com isso, que não é necessário muito volume (em tempo) de exercício para obtermos aumento de HSP70 e que este aumento está correlacionado positivamente com o aumento da intensidade, de forma que, quanto mais alta, maior será a indução da proteína no hipotálamo, apresentando. Um resultado semelhante foi encontrado no músculo esquelético de humanos, mostrando uma dependência da intensidade sobre a indução de HSP70 pelo exercício, logo após a realização do mesmo (Liu *et al.*, 2000). Em outro estudo, em que foi realizado um protocolo de exercício aeróbio exaustivo em cicloergômetro, encontrou-se aumento de 3100 % na expressão de HSP70, 6 dias após a sessão aguda de exercício, em relação aos valores anteriores à intervenção (Khassaf *et al.*, 2001).

O aumento na expressão de HSP70 após o exercício de alta intensidade repetiu-se ao analisarmos os animais que passaram por 8 semanas de treinamento, dos quais o grupo com carga de 8% do peso corporal teve expressão aumentada em comparação ao animais em repouso e com 2% e 4% de carga. Ficou evidente também uma correlação positiva entre o nível de HSP70 e o aumento da intensidade de exercício. Lembrando que nos animais treinados, a análise aconteceu apenas 72 h após a última sessão de exercício, para que não houvesse mais influência da mesma. Como no grupo agudo, onde a análise ocorreu 72 h após exercício, não houve diferença no nível de expressão de HSP70 observada no grupo 8%,

confirmamos que as alterações apresentadas no grupo que treinou por 8 semanas se dava em níveis basais, como uma adaptação ao treinamento de alta intensidade. Outros estudos (Liu *et al.*, 1999; Vogt *et al.*, 2001) mostraram resultados semelhantes, mas também na musculatura esquelética. Em humanos que realizaram 4 semanas de treinamento de remo, que é uma abordagem complexa por variar a duração e a intensidade, foi demonstrado um aumento na expressão de HSP70 a partir do final da primeira semana, com pico de aumento no final da segunda, quando foram aumentados o volume e a intensidade de exercício. Nas semanas seguintes, os valores de HSP70 foram menores que os da segunda semana, mas se mantiveram maiores que os valores anteriores ao treinamento (Liu *et al.*, 1999). No outro estudo, foi utilizado treinamento de 6 semanas durante a qual os indivíduos realizavam exercício de alta (lactemia entre 4-6 mM) e baixa intensidade (lactemia ente 2-3mM), em condições de normóxia e hipóxia, 5x por semana, em cicloergômetro. Foi avaliada a expressão do mRNA da HSP70 no músculo esquelético, antes e ao final do treinamento, e foi demonstrado que somente o treinamento de alta intensidade foi capaz de alterar os níveis de mRNA desta proteína, nas duas situações impostas. Os autores relacionaram este aumento com o estresse metabólico imposto pelo exercício de alta intensidade, demonstrado pela elevação dos níveis de lactemia acima do limiar, atribuindo a este a causa da elevação dos níveis do mRNA desta proteína (Vogt *et al.*, 2001).

É interessante ressaltar que nossos animais foram submetidos a exercícios de intensidade ainda mais elevada e, apesar de nadarem por apenas 20 minutos, o grupo com carga de 8% de seu peso no exercício agudo obteve uma concentração média de lactemia de 17 mM, bem mais elevada que a obtida no treinamento de alta intensidade por 6 semanas citado anteriormente (Vogt, 2001). Nossos resultados obtidos com a natação de diferentes intensidades mostram uma correlação positiva entre o nível de lactemia imediatamente após o término da sessão e a expressão de HSP70 12 h após a sessão de exercício. Outro resultado obtido que reforça esta correlação é que o local onde a expressão de HSP70 se mostrou aumentada é justamente na eminência mediana e no núcleo arqueado do hipotálamo, ou seja, em estruturas fundamentais para a regulação do metabolismo energético e nível glicêmico em geral, além de estarem próximas do terceiro ventrículo, em localização onde a barreira hematoencefálica é mais permeável (Levin *et al.*, 1999; Elmquist *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012; Routh *et al.*, 2012). Também podemos perceber que a maior parte da expressão de HSP70 está colocalizada com os astrócitos (marcados com GFAP), mostrando que a indução da proteína gerada pelo exercício físico de alta intensidade

foi por este tipo celular, provavelmente para proteger os neurônios, que tem baixa capacidade de induzir HSP70. O lactato pode não somente ser utilizado como fonte energética pelos neurônios, como também atuar no núcleo arqueado regulando a ingestão alimentar e o metabolismo energético periférico, controlando até mesmo a produção e utilização de glicose (Elmqvist *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2007).

Avaliando o metabolismo da glicose, verificamos, em primeiro lugar, que o animal que se exercitou a 8%, ao contrário que se esperava, mostrou valores glicêmicos mais baixos, quando comparado com o repouso e o grupo 4%. Quanto maior era a intensidade de exercício, menor era a quantidade de 2-desóxi-glicose radiomarcada captada pelo hipotálamo imediatamente após o exercício, e esse resultado se manteve até mesmo 12 h após o final da sessão, normalizando em 72 h. Apesar disso, os valores de conteúdo de glicogênio do hipotálamo aumentaram com o incremento da intensidade, fato que continuou 12 h após a sessão, e somente normalizou em 72 h, assim como a captação de glicose. Como seria possível que o hipotálamo do animal que se exercitou com 8% de carga poderia acumular mais glicogênio, se foi observada uma menor captação de glicose nesta região? E como poderia o encéfalo, em uma situação de demanda energética tão elevada como o exercício de alta intensidade, ficar com níveis reduzidos de substrato energético? É claro que deve haver alguma outra molécula sendo captada e oxidada para a formação de ATP, pois a “hierarquia encefálica” não permitiria que todo o direcionamento de energia fosse para os órgãos periféricos, o que poderia causar grandes danos aos neurônios, tão sensíveis à privação energética. De fato, imediatamente após o exercício, houve um grande aumento na captação de lactato radiomarcado pelo hipotálamo do animal que se exercitou com 8% de carga, e este aumento foi significativamente diferente dos grupos repouso e 4%. Do mesmo modo, o fígado e o coração também captaram mais lactato com a execução do exercício de alta intensidade. Ao comparar os diferentes tecidos, somente o fígado do animal 8% teve uma captação maior que a do hipotálamo e do coração, mas estes últimos não diferiram entre si, mostrando que o hipotálamo tem uma grande avidez por captar lactato, chegando a captar valores iguais aos do coração por grama de tecido.

Em termos metabólicos, o uso do lactato é um meio muito mais rápido e econômico para o sistema nervoso central de conseguir energia. Primeiro, porque há uma grande disponibilidade deste substrato no sangue do animal que se exercitou em alta intensidade e, com o fluxo sanguíneo aumentado pelo exercício, este alcança rapidamente o sistema nervoso central e, por transportadores específicos, ultrapassa rapidamente a barreira hematoencefálica,

sendo facilmente captado pelos neurônios para ser utilizado. Os neurônios hipotalâmicos do núcleo arqueado possuem um transportador monocarboxílico de alta afinidade, facilitando a entrada de lactato, que é então transformado pela LDH em piruvato (Bergersen, 2007), o qual pode adentrar a mitocôndria e gerar ATP pela fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de elétrons (Nelson e Cox, 2011). Segundo, evita as 10 etapas da via glicolítica, além da etapa limitante da enzima hexocinase, que satura muito rápido (Newsholme e Leech, 1983). Como vimos também, no grupo 8% não há diminuição dos estoques de glicogênio presentes nos astrócitos imediatamente após a sessão de exercício. Este dado vai contra resultados de outros estudos, nos quais foi demonstrada a redução de 34% no conteúdo de glicogênio no hipotálamo após exercício exaustivo, mas apenas quando este foi executado por 120 minutos (Matsui *et al.*, 2011). Estes autores relataram, ainda, uma redução de 29% no glicogênio hipotalâmico após execução de exercício de intensidade moderada até exaustão e que o treinamento por 3 semanas, de 60 minutos diários em intensidade moderada, não alterava o conteúdo basal de glicogênio nesta mesma estrutura, avaliado 72 h após a última sessão. Por outro lado, um fato interessante encontrado foi uma supercompensação no conteúdo de glicogênio, tanto no músculo quanto em regiões encefálicas, onde este se mostrava elevado algumas horas depois, e este aumento era proporcional à quantidade de glicogênio que foi reduzida nestas áreas quando avaliado imediatamente após o exercício. Verificou também que o pico desta supercompensação se dava em momentos diferentes quando avaliado os diferentes tecidos, no músculo foi em 24 h após o final do exercício e no encéfalo 6 h depois da realização do mesmo (Matsui *et al.*, 2012). Esta supercompensação poderia explicar o aumento de glicogênio que observamos no grupo 8% 12 h após a sessão de exercício, mas não o aumento imediatamente após a sessão. Lembrando que apesar dos protocolos de Matsui *et al.* (2011, 2012) serem executados até exaustão, a intensidade utilizada era moderada, o que permitia um aumento na duração do exercício, ao contrário do nosso estudo, no qual os animais chegavam à exaustão em apenas 20 minutos, ou seja, a intensidade utilizada foi muito maior. Sendo assim, a provável razão para encontrar valores mais elevados de glicogênio no grupo 8% seria porque os grupos das demais intensidades estariam utilizando seus estoques energéticos para manter a atividade neural, enquanto que o grupo 8% abriria mão da quebra dos seus estoques, pois estaria recebendo altos níveis de lactato pela corrente sanguínea, que adentram diretamente nos neurônios, reduzindo assim o gasto energético e o tempo gasto na glicogenólise. Um dado que sustenta esta hipótese é a presença de receptores de lactato em neurônios, o GPR81, que causa reduções nos níveis de AMP cíclico, inibindo a lipólise e quebra de glicogênio, pela presença do outro substrato disponível (Lauritzen *et al.*, 2013).

Em estudos com humanos (Ide *et al.*, 1999; Ide *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2002; Dalsgaard, 2003; Kemppainen *et al.*, 2005) utiliza-se a diferença arterial-venosa de lactato, tomografia de emissão de pósitrons e desóxi-glicose marcada para avaliar a demanda energética encefálica. Os resultados encontrados foram semelhantes aos de nosso estudo, pois os autores verificaram que em exercícios de alta intensidade, havia um aumento da captação de lactato pelo sistema nervoso, que não foi encontrado no sangue venoso, ou seja, o lactato estava sendo utilizado. Esse aumento na captação foi dependente da concentração sanguínea do lactato, que conseqüentemente, acompanhava uma redução na captação e utilização de glicose pelo encéfalo, sendo assim, a modificação de ambos está diretamente correlacionada com o aumento da intensidade do exercício. O lactato passa então a ser mais utilizado para compensar o aumento na necessidade de energia para manter a atividade neuronal durante o exercício de alta intensidade (Ide *et al.*, 1999; Ide *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2002; Dalsgaard, 2003; Kemppainen *et al.*, 2005). Um outro estudo avaliou valores de glicose e lactato do hipotálamo de ratos que realizaram uma sessão de natação com 6% de carga e nadaram até a exaustão (média de 150 minutos). Houve uma redução nos níveis de glicose no dialisado do hipotálamo, até um dia depois da intervenção, e aumento nos níveis de lactato por até 3 dias depois (Wang *et al.*, 2002).

O próximo objetivo foi verificarmos se o aumento sanguíneo das concentrações de lactato sozinho poderia exercer efeitos sobre a expressão de HSP70 no hipotálamo. Para tanto, injetamos L-lactato por via intraperitoneal ou intravenosa, calculado para que a concentração sanguínea final mimetizasse as encontradas nas diferentes intensidades de exercício, e avaliamos a expressão de HSP70 12 h após a intervenção. Em nossos experimentos não encontramos diferença na expressão desta proteína em nenhuma das concentrações utilizadas, e em nenhum dos métodos (intraperitoneal ou intravenoso). Isso nos prova que a simples alteração nas concentrações sanguíneas de lactato não foi capaz de alterar a indução de HSP70 *in vivo*, ao menos 12 h após o término do exercício. Do contrário, um estudo (Coco *et al.*, 2013) realizado com cultura de células, avaliou-se também a influência direta de diferentes concentrações de L-lactato sobre a expressão de HSP70, em cultura de astrócitos humanos e de outra linhagem celular humana SH-SY5Y, parecida com neuroblastoma, um modelo apropriado para estudar neurotoxicidade. Utilizaram as concentrações de 5, 10 e 25 mmol/L, e incubaram por 4 ou 24 h, quando realizaram as análises. Os efeitos na expressão de HSP70 foram dependente da concentração, ou seja, quanto maior a concentração de L-lactato

no meio, maior foi a indução da proteína, tanto no tempo 4 h quanto no tempo 24 h, nos astrócitos e SH-SY5Y (Coco *et al.*, 2013).

Com o objetivo de não eliminarmos os outros fatores que também são alterados durante o exercício, injetamos D-lactato 10 minutos antes da execução do mesmo, nas diferentes intensidades, e em uma concentração proporcional ao dobro da média encontrada de lactato em cada um dos grupos após exercício, para que esta molécula competisse com o lactato endógeno, considerando que o D-lactato, apesar de transportado para dentro das células, quase não é metabolizado (Ewaschuck, *et al.*, 2005). Não houve modificações quanto à glicemia, mas os níveis de lacticemia do grupo que se exercitou com 8% de carga eram menores do que os animais 8% que não receberam D-lactato, provavelmente por este evitar um aumento na produção do lactato endógeno. Quanto à expressão de HSP70, a injeção de D-lactato bloqueou o efeito antes observado de aumento da sua expressão no grupo exercitado a 8%, pois agora os animais não diferiam mais entre si na expressão de HSP70. Fato este que comprova a relação da lacticemia com a expressão de HSP70 no hipotálamo induzida pelo exercício, ainda que as alterações na lacticemia não sejam a única responsável.

Qual seria, então, o outro possível candidato que poderia estar envolvido nesta relação entre o aumento da lacticemia e HSP70 no hipotálamo? Qual seria o outro fator que também pode ser alterado apenas quando o exercício é executado em alta intensidade? Considerando tratar-se de uma condição de estresse, um mecanismo possível seria o controle por catecolaminas, neste caso, adrenalina e noradrenalina, que têm seus níveis elevados no sangue quando o exercício é executado acima do limiar de lactato (Soya *et al.*, 2007). Pois bem, durante o exercício físico, o músculo esquelético e tecido adiposo são capazes de captar a glicose via GLUT4 sem auxílio da insulina, o que aumenta, assim, a captação de glicose por esses tecidos. Tal fato faz com que o sistema nervoso central ative o sistema nervoso simpático, com o intuito de aumentar a produção de lactato pelo músculo esquelético, que é feito por ação da noradrenalina (Hamann *et al.*, 2001), para que o lactato esteja disponível para uso como substrato energético pelo fígado e encéfalo, já que o fluxo de glicose está sendo direcionado para os tecidos periféricos (Shepherd e Kahn, 1999; Zorgano *et al.*, 2002; Pellerin e Magistretti, 2011).

Sabe-se que a sinalização α adrenérgica é capaz de aumentar a regulação transcricional de HSP70 em hemócitos de molusco (Lacoste *et al.*, 2001), enquanto que no encéfalo de ratos, a depleção noradrenérgica pode reduzir sua expressão (Heneka *et al.*, 2003).

Quando ratos foram expostos a um estresse psicológico (exposição ao gato), estes mostraram níveis de HSP72 aumentados no hipotálamo e na circulação e esta resposta foi atenuada ou mesmo bloqueada quando o animal foi adrenalectomizado 10 dias antes da exposição ao estresse (Fleshner *et al.*, 2004). Sendo assim, criando uma relação entre o sistema adrenérgico e a expressão da proteína que investigamos.

A partir destes estudos, realizamos os experimentos com os bloqueadores α adrenérgicos, a fim de verificar se com o bloqueio destes receptores antes do início do exercício, teríamos também um desaparecimento na diferença de expressão de HSP70 no hipotálamo. Foram aplicados intraperitonealmente os bloqueadores α_1 , α_2 e os dois ao mesmo tempo, 30 minutos antes do início da sessão de exercício nas diferentes intensidades. No bloqueio α_1 e no duplo não houve mais redução na glicemia observada no grupo 8% com PBS e também com o bloqueio do receptor α_2 . Não foram encontradas alterações significativas nos níveis de laticemia entre os diferentes tratamentos. Em relação à expressão de HSP70, todos os bloqueadores foram capazes de elevar os níveis desta proteína no grupo repouso, ou seja, mostrando um efeito apenas dos bloqueadores. Os grupos que se exercitaram em diferentes intensidades e que receberam os bloqueadores de receptor α_2 e o duplo, não diferiam entre si, ou seja, estes foram capazes de bloquear o efeito da intensidade de exercício sobre a expressão da proteína. Mas, o resultado que mais chamou atenção foi o do bloqueador α_1 , que não somente bloqueou o efeito do aumento no grupo 8%, como inclusive reduziu a níveis significativamente menores quando comparado com o animal repouso, mostrando que a ação catecolaminérgica via receptor α_1 parece ser uma das principais responsáveis pelo aumento da HSP70 12 h após o exercício de alta intensidade. Se essa interferência adrenérgica ocorre apenas em nível central ou depende de alterações periféricas bloqueadas pelas drogas utilizadas permanece por ser esclarecido.

Em um estudo com exercício de moderada intensidade, no qual foram realizadas 2 infusões de L-lactato durante os 90 minutos de exercício, houve redução na resposta catecolaminérgica plasmática, que foi atribuído por retroalimentação negativa do lactato sobre a produção de catecolaminas (Fattor, 2005). Em outro estudo mais recente, o L-lactato foi administrado diretamente no *locus coeruleus* de ratos (Tang *et al.*, 2014). Verificou-se que o lactato, independente de seu valor calórico, serve como uma molécula sinalizadora astrocítica no *locus coeruleus*, excitando os neurônios noradrenérgicos e, conseqüentemente, liberando noradrenalina. O L-lactato exógeno exerceu ação despolarizante diretamente sobre os

neurônios do *locus coeruleus*, resultando em efeitos excitatórios similares aos observados quando injetado L-glutamato no *locus coeruleus* (Tang *et al.*, 2014). Estes autores propõem que este efeito despolarizante do L-lactato seja intermediado por um segundo mensageiro intracelular, provavelmente AMPc. O uso de D-lactato bloqueou efetivamente este efeito, como foi observado no presente estudo.

Se, de fato, o L-lactato atua como um neurotransmissor que estimula neurônios noradrenérgicos (Tang *et al.*, 2014) e a noradrenalina tem ação estimulatória via receptor α_1 sobre a expressão de HSP70 em situação de exercício de alta intensidade, pode-se supor que haja uma interdependência destas duas condições para o aumento de HSP70 sob exercício intenso: estímulo noradrenérgico e nível elevado de lactato. Durante exercício de alta intensidade também se observa aumento de lactato, que, por sua vez, também induz maior expressão de HSP70 (dados do presente trabalho). Esta inter-relação pode explicar o fato de não encontrarmos diferenças na captação de glicose e lactato no experimento *ex vivo*, mesmo com o aumento na concentração de L-lactato no meio, pois o hipotálamo isolado não dispõe de um fator importante dentre todas as condições encontradas durante o exercício intenso: a influência adrenérgica ou noradrenérgica.

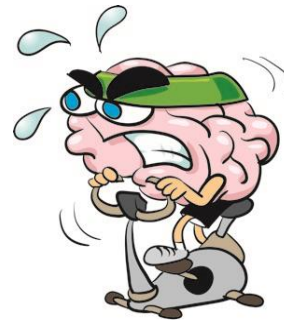
Outra relação entre o lactato e a noradrenalina, é que esta causa aumentos na expressão de MCT2 em cultura de neurônios corticais de camundongos, por um mecanismo que envolve a estimulação da via PI3K/Akt (Chenal e Pellerin, 2007), um mecanismo muito similar ao envolvido na liberação de HSP70 pelos astrócitos (Taylor *et al.*, 2007). O sistema noradrenérgico poderia então, não somente aumentar a expressão e liberação de HSP70 pelos astrócitos, como também poderia estimular a captação e utilização de lactato pelos neurônios, aumentando a expressão de MCT2. Além disso, essa via retroalimentar entre lactato e noradrenalina, pode promover, em longo prazo, uma “memória metabólica”, que está relacionada com a plasticidade sináptica (Chenal e Pellerin, 2007), fazendo com que o encéfalo seja capaz de utilizar mais lactato ao invés de glicose, mesmo em situações basais.

O lactato também é capaz de inativar a AMP cinase, o que causa aumento de malonil-CoA no hipotálamo, suprimindo a expressão de peptídeos orexígenos e aumentando a de anorexígenos, o que reduz a ingestão alimentar (Cha e Lane, 2009). Fato, este, corroborado por outro estudo, que avaliou a presença de MCT2 em neurônios no núcleo arqueado, que controlam a ingestão alimentar, sugerindo um efeito direto do lactato sobre os neurônios excitáveis por glicose, provocando uma liberação de peptídeos anorexígenos e,

consequentemente, redução da ingestão alimentar (Campos *et al.*, 2013). Na eminência mediana de camundongos foram encontrados tanicitos que são capazes de se diferenciar em neurônios em resposta a uma dieta rica em gorduras e que o bloqueio desta diferenciação foi capaz de atenuar o ganho de peso nesses animais (Lee *et al.*, 2012). Esses dados nos mostram a importância dessas estruturas no controle do metabolismo energético e do comportamento alimentar.

Sabemos que falhas nessas vias hipotalâmicas e na redistribuição de energia são possíveis causas de doenças metabólicas como a obesidade e diabetes do tipo II. Além disso, dietas com altos níveis de gordura são capazes de causar danos por estresse oxidativo e do retículo endoplasmático, o que induz, também, níveis elevados de atividade inflamatória nesta região em um curto espaço de tempo, agravando o estado patológico, ativando vias apoptóticas e causando morte neuronal (Ropelle *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2007; Moraes *et al.*, 2009; Liebelt *et al.*, 2010; Meng e Cai, 2011; Thaler *et al.*, 2012). Neste sentido, o aumento de HSP70 na eminência mediana e no núcleo arqueado do hipotálamo, encontrado neste estudo, poderia agir como uma molécula citoprotetora, pois é capaz de bloquear a fosforilação do complexo I κ B e, consequentemente, a ativação do NF- κ B, que é o principal responsável pelo aumento na síntese de citocinas e enzimas pró-inflamatórias ativadoras da cascata apoptótica. Esse aumento de HSP70 poderia proteger as células dos danos metabólicos, e ainda, prevenir a morte de neurônios envolvidos no controle alimentar. Além disso, o exercício causa alterações na utilização de substratos energéticos pelo hipotálamo, criando uma “memória metabólica”, a fim de gerar um sistema mais econômico e eficiente de distribuição de energia, desenvolvendo mecanismos para utilizar mais lactato ao invés de glicose, com participação da via adrenérgica.

Cabe salientar que os resultados obtidos foram induzidos pelo exercício de alta intensidade, de curta duração, executado de forma aguda, e também por treinamento de 8 semanas, de maneira que este pode ser um efetivo meio de prevenção e até mesmo de intervenção para o controle de danos hipotalâmicos causados por doenças metabólicas. Os dados obtidos neste trabalho e a revisão dos dados de trabalhos relacionados resulta em uma proposta esquematizada na Figura 29, que ilustra como o exercício intenso poderia levar ao aumento de HSP70 hipotalâmico e a uma ativação das vias noradrenérgicas, intermediado pelo lactato.



Exercício intenso

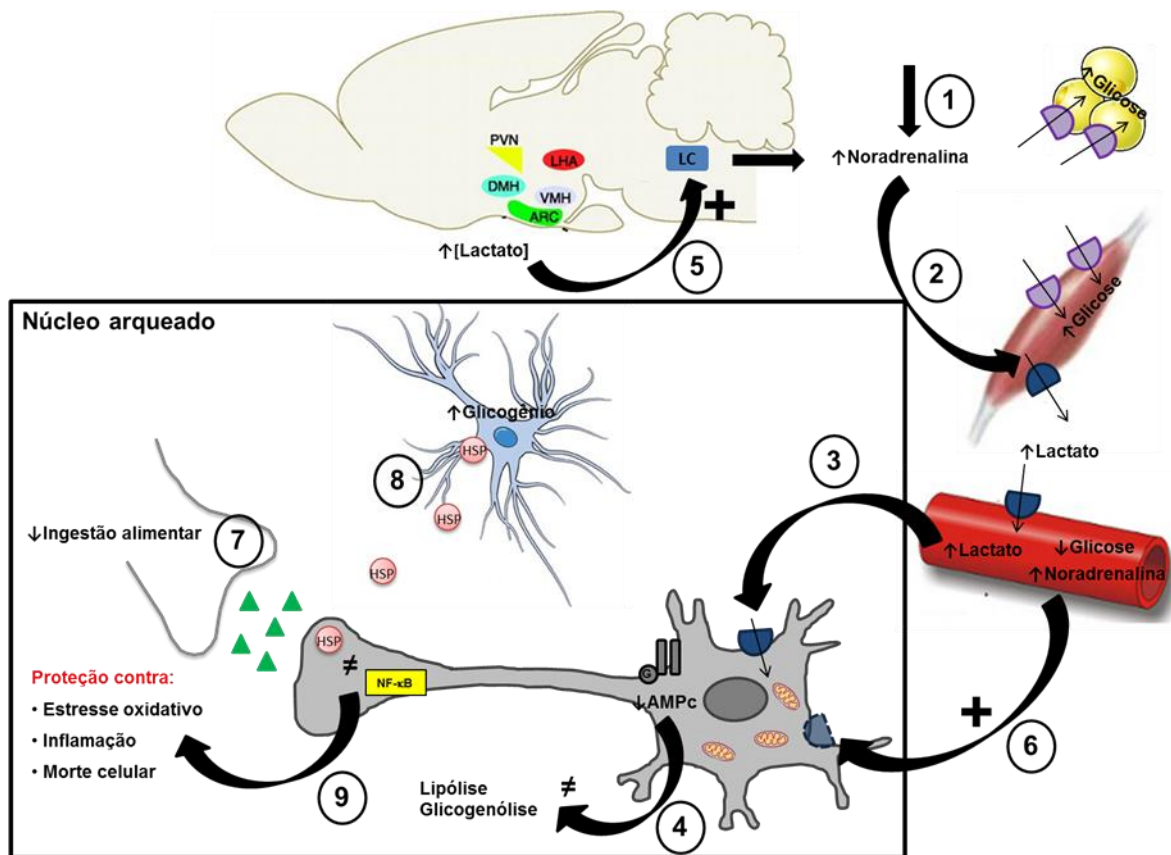


Fig. 29. Figura representativa dos resultados encontrados e dos possíveis mecanismos de regulação. 1. O exercício de alta intensidade causa elevação na produção e liberação de noradrenalina. 2. O GLUT4 é capaz de captar glicose para o músculo e tecido adiposo sem a necessidade de insulina. O músculo aumenta sua produção e liberação de lactato na corrente sanguínea pela estimulação noradrenérgica. 3. Elevados níveis na laticemia fazem com que o hipotálamo capte mais lactato, ao invés de glicose, via MCT1. Este lactato pode então ser oxidado e utilizado para formação de ATP pelos neurônios. 4. A ativação do receptor de lactato, GPR81, reduz os valores de AMP cíclico, o que bloqueia a lipólise e glicogenólise, preservando os estoques de glicogênio. 5. Este aumento nas concentrações de lactato faz com que esta molécula excite os neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus, aumentando mais ainda a liberação de noradrenalina. 6. O aumento de noradrenalina causa um aumento na expressão de MCT2, para que o hipotálamo seja capaz de utilizar ainda mais lactato, levando a uma

plasticidade metabólica. **7.** O aumento da concentração de lactato também atua sobre os neurônios excitáveis pela glicose, fechando canais de K_{ATP} (canal de potássio sensível ao ATP), despolarizando a célula e liberando, assim, peptídeos anorexígenos, que causam saciedade e diminuem a ingestão alimentar. **8.** Devido ao estímulo noradrenérgico e da grande demanda e variação metabólica há um aumento na expressão de HSP70 e sua exportação via exossomos pelos astrócitos, para que os neurônios possam então captar esta proteína. **9.** Como resultado, a HSP70 irá bloquear o NF- κ B, e conseqüentemente, as vias inflamatórias e pró-apoptóticas, protegendo os neurônios de qualquer injúria.

6. CONCLUSÃO

O exercício de natação realizado em diferentes intensidades causou as seguintes alterações:

- O exercício de alta intensidade (8% de carga) foi capaz de elevar a expressão de HSP70 12 h após a realização de uma sessão aguda, e os valores da proteína tiveram uma correlação positiva com o aumento da intensidade de exercício e com as concentrações médias de lactemia das diferentes intensidades imediatamente após o exercício.
- Imediatamente após a sessão de exercício, houve uma diminuição na captação de 2-desóxi glicose pelo hipotálamo do grupo que realizou exercício de maior intensidade quando comparado com os demais, o que se seguiu por 12 h, normalizando apenas em 72 h. Isto aconteceu devido à maior disponibilidade de lactato sanguíneo oferecido pelo grupo 8%, fazendo com que o hipotálamo captasse mais lactato para ser utilizado ao invés da glicose, um substrato mais rápido e econômico.
- As mudanças na captação de glicose e lactato pelo hipotálamo parecem ser dependentes de mais algum estímulo, possivelmente a noradrenalina, pois quando o hipotálamo isolado é exposto a diferentes concentrações de L-lactato, não há mudanças de captação de ambos os substratos por este tecido.
- Os níveis de glicogênio do grupo de alta intensidade foram mais elevados quando comparado com os outros grupos, possivelmente pelo bloqueio da glicogenólise causado pela elevação das concentrações de lactato, economizando este estoque de energia.
- O L-lactato isolado não tem efeito sobre a expressão de HSP70 no hipotálamo, comprovado pela injeção de L-lactato em diferentes concentrações.
- A injeção de D-lactato antes do exercício foi capaz de eliminar as diferenças na expressão de HSP70 no hipotálamo induzida pelo exercício, sugerindo assim um efeito do lactato sobre as mudanças encontradas no exercício de alta intensidade.
- O bloqueio de receptores α -adrenérgicos também foi capaz de bloquear o efeito do exercício sobre a expressão de HSP70 no hipotálamo, com uma influência maior do bloqueio do receptor α_1 , que apresentou valores reduzidos de HSP70 no grupo 8% quando comparado com o repouso.
- O treinamento por 8 semanas foi capaz de elevar os níveis basais de HSP70 no hipotálamo e reduzir a captação de 2-desóxi glicose mesmo em repouso, mostrando

uma resposta adaptativa deste tecido ao exercício de alta intensidade realizado cronicamente.

Estes resultados nos mostram que o exercício de curta duração é capaz de aumentar a expressão de HSP70 na eminência mediana e núcleo arqueado do hipotálamo, se realizado em alta intensidade, e que este é dependente da elevação da lactícemia e da via α adrenérgica, principalmente por receptores $\alpha 1$. O treinamento de alta intensidade causou respostas adaptativas na expressão da proteína e no metabolismo energético. Concluimos assim, que o aumento desta proteína possa estar envolvido na proteção contra estresse metabólico, prevenindo assim danos maiores quando exposto a insultos de maior magnitude.

7. BIBLIOGRAFIA

- Anand BK, China GS, Sharma KN, Dua S, Singh B. Activity of single neurons in the hypothalamus feeding centers: Effect of glucose. *Am J Physiol.* 2207:1146 – 54. 1964.
- Asea A. Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72. *Exerc Immunol Rev.* 11, 34-45. 2005.
- Åkerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11, 545–555. 2010.
- Belay, HT, Brown IR. Cell death and expression of heat-shock protein Hsc70 in the hyperthermic rat brain. *J Neurochem,* 97 (Suppl. 1), 116–119. 2006.
- Bellmann K, Jaattela M, Wissing D, Burkart V, Kolb H. Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett.* 391: 185–188. 1996.
- Bergersen LH. Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience.* 145, 11–19. 2007.
- Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol.* 38(1):1-17. 1994.
- Brooks GA. Lactate shuttle-between but not within cells? *J. Physiol.* 541, 333–334. 2002.
- Burdakov D, Luckman SM, Verkhratsky A. Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360, 2227–2235. 2005.
- Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress induced apoptosis. *J Biol Chem.* 273: 17147–17153. 1998.
- Campisi J, Leem TH, Greenwood BN, Hansen MK, Moraska A, Higgins K, Smith TP, Fleshner M. Habitual physical activity facilitates stress-induced HSP72 induction in brain, peripheral, and immune tissues. *Am J Physiol Regul Inter Comp Physiol.* 284, 520-530. 2003.

- Campos CC, Elizondo R, Carril C, Martínez F, Boric F, Nualart F, Robles MAG. MCT2 Expression and Lactate Influx in Anorexigenic and orexigenic neurons of the arcuate nucleus. *Plos one*. Volume 8, Issue 4. 2013.
- Cha SH, Lane MD. Central lactate metabolism suppresses food intake via the hypothalamic AMP kinase/malonyl-CoA signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 386, 212–216. 2009.
- Chan SL, Dunne MJ, Stillings MR, Morgan NG. The alpha 2-adrenoceptor antagonist efaroxan modulates K⁺ ATP channels in insulinsecreting cells. *Eur. J. Pharmacol*. 204, 41–48. 1991.
- Chapman JC, McClenaghan NH, Cosgrove KE, Hashmi MN, Shepherd RM, Giesberts AN, White SJ, Ammala C, Flatt PR, Dunne MJ. ATP-sensitive potassium channels and efaroxan-induced insulin release in the electrofusion-derived BRIN-BD11 beta-cell line. *Diabetes*. 48, 2349–2357. 1999.
- Chari M, Lam CKL, Wang PYT, Lam TKT. Activation of central lactate metabolism lowers glucose production in uncontrolled diabetes and diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 57:836–840. 2008.
- Chen ZC, Wu WS, Lin MT, Hsu CC. Protective effect of transgenic expression of porcine heat shock protein 70 on hypothalamic ischemic and oxidative damage in a mouse model of heatstroke. *BMC Neurosci*. 10:111. 2009.
- Chenal J, Pellerin L. Noradrenaline enhances the expression of the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 by translational activation via stimulation of PI3K/Akt and the mTOR/S6K pathway. *J Neurochem*. 102: p.389–397.2007.
- Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MHS, Mesa JL, Lancaster GL, Southgate RJ, Bruce CR, Duffy SJ, Horvath I, Mestrlil R, Watt MJ, Hooper PL, Kingwell BA, Vigh L, Hevener A, Febbraio MA. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *PNAS*. vol. 105, no. 5. 2008.

- Clark BD, Brown IR. Axonal transport of a heat shock protein in the rabbit visual system (hyperthermia/retina/D-lysergic acid diethylamide/protein synthesis in vivo). *Neurobiology*. Vol. 82, pp. 1281-1285. 1985.
- Coco M, Caggia S, Musumeci G, Perciavalle V, Graziano ACE, Pannuzzo G, Cardile V. Sodium L-Lactate differently affects brain-derived neurotrophic factor, inducible nitric oxide synthase, and heat shock protein 70 kDa production in human astrocytes and SH-SY5Y cultures. *J Neurosci Res*. 91:313–320. 2013.
- Dalsgaard MK, Quistorff B, Danielsen ER, Selmer C, Vogelsang T, Secher NH. A reduced cerebral metabolic ratio in exercise reflects metabolism and not accumulation of lactate within the human brain. *J Physiol*. 554.2. p.571-578. 2003.
- De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*. 11(1):1-12. 1999.
- Ding XZ, Smallridge RC, Galloway RJ, Kiang JG. Increases in HSF1 translocation and synthesis in human epidermoid A-431 cells: role of protein kinase C and $[Ca^{2+}]_i$. *J. Investig. Med*. 44: 144–153. 1996.
- Elmqvist, JK, Coppari R, Balthasar N, Ichinose M, Lowell BB. Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J Comp Neurol*. 493:63–71. 2005.
- Ewashuck JB, Naylor JM, Zello GA. D-lactate in Human and Ruminant metabolism. *J Nutrit*. 2005.
- Fattor JA, Miller BF, Jacobs KA, Brooks GA. Catecholamine response is attenuated during moderate-intensity exercise in response to the “lactate clamp”. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 288: E143–E147. 2005.
- Febbraio MA, Mesa JL, Chung J, Steensberg A, Keller C, Nielsen HB, Krstrup P, Ott P, Secher NH & Pedersen BK. Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans. *Cell Stress Chaperones* 9, 390-396. 2004.

- Febbraio MA, Kokoulas I. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *J Appl Physiol.* 89: 1055–1060. 2000.
- Fehrenbach E, Niess AM, Voelker K, Northoff H & Mooren FC. Exercise intensity and duration affect blood soluble HSP72. *Int J Sports Med* 26, 552-557. 2005.
- Fehrenbach E, Niess AM, Scholotz E, Passek F, Dickhuth HH, Northoff H. Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners. *J Appl Physiol.* 89, 704. 2000.
- Fisher-Wellman K & Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* 8, 1. 2009.
- Ferreira LS, Álvaro AR, Aveleira C, Santana M, Brandão I, Kügler S, Almeida LP, Cavadas C. Proliferative hypothalamic neurospheres express NPY, AGRP, POMC, CART and orexin-a and differentiate to functional neurons. *Plos One.* 2011.
- Flavahan NA, McGrath JC. Blockade by yohimbine of prazosin-resistant pressor effects of adrenaline in the pithed rat. *Br J Pharmacol.* 69(3): 355–357. 1980.
- Fleshner M, Campisi J, Amiri L, Diamond DM. Cat exposure induces both intra- and extracellular Hsp72: the role of adrenal hormones. *Psychoneuroendocri.* 29(9):1142-52. 2004.
- Frydman J, Nimmesgern E, Ohtsuka K, Hartl FU. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature.* 370:111–117. 1994.
- Fruehwald-Schultes B, Kern W, Born J, Fehm HL, Peters A. Comparison of the inhibitory effect of insulin and hypoglycemia on insulin secretion in humans. *Metabolism.* 49, 950–953. 2000.

- Fujita S, Donovan CM. Celiac-superior mesenteric ganglionectomy, but not vagotomy, suppresses the sympathoadrenal response to insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes*. 54, 3258–3264. 2005.
- Giacca A, Groenewoud Y, Tsui E, McClean P, Zinman B. Glucose production, utilization, and cycling in response to moderate exercise in obese subjects with type 2 diabetes and mild hyperglycemia. *Diabetes*. 47, 1763–1770. 1998.
- Gladden LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J. Physiol*. 558, 5–30. 2004.
- Goldim JR. Pesquisa em Saúde: Leis Normas e Diretrizes HCPA, Porto Alegre. 1995.
- Gupte AA, Bomhoff GL, Swerdlow HR, Geiger PC. Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Diabetes*. Vol. 58. 2009.
- Guzhova I; Kislyakova K; Moskaliova O; Fridlanskaya I; Tytell M; Cheetham M; Margulis B. In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res*. v.914, p.66-73. 2001.
- Hayes K; Sprague S; Guo M; Davis W; Friedman A; Kumar A; Jimenez DF; Ding Y. Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta Neuropathol*. 115:289–296. 2008.
- Heneka MT, Gavrilyuk V, Landreth GE, O'Banion MK, Weinberg G, Feinstein DL. Noradrenergic depletion increases inflammatory responses in brain: effects on I κ B and HSP70 expression. *J Neurochem*. 85, 387–398. 2003.
- Hooper PL, Hooper JJ. Loss of defense against stress: diabetes and heat shock proteins. *Diabetes Technol Ther*, v.7, n.1, p.204-208. 2005.
- Ide K, Schmalbruch IK, Quistorff B, Horn A, Secher NH. Lactate, glucose and O₂ uptake in human brain during recovery from maximal exercise. *J Physiol*. 522.1, pp. 159—164 159. 2000.

- Ide K, Horn A, Secher NH. Cerebral metabolic response to submaximal exercise the. *J Appl Physiol*. 1999.
- Kaneko M Abe K, Kogure K, Saito H, Matsuki N. Correlation between electroconvulsive seizure and HSC70 mRNA induction in mice brain. *Neurosci. Lett*. 157:195–198. 1993.
- Kelley PM, Schlesinger MJ. The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. *Cell* 15: 1277–1286. 1978.
- Kemppainen J, Aalto S, Fujimoto T, Kalliokoski KK, Oikonen V, Rinne J, Nuutila P, Knuuti J. High intensity exercise decreases global brain glucose uptake in humans. *J Physiol* 568.1. pp 323–332. 2005.
- Khassaf M. Child RB, McArdle A, Brodie DA, Esanu C, Jackson MJ. Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. *J Appl Physiol*. 90: 1031–1035. 2001.
- Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther*. Vol. 80, No. 2, pp. 183–201. 1998.
- Krause MS, de Bittencourt PI Jr. Type 1 diabetes: can exercise impair the autoimmune event? The L-arginine/glutamine coupling hypothesis. *Cell Biochem Funct*. 26 (4):406-33. 2008.
- Kregel KC, Allen DL, Booth FW, Fleshner M, Henricksen E, Musch TI, O'Leary DS, Parks CM, Poole DC, Ra'anan AW, Sheriff DD, Sturek MS & Toth LA. Resource Book for the Animal Exercise Protocols. American physiological Society. 2006.
- Kumar K, Wu X, Evans AT, Marcoux F. The effect of hypothermia on induction of heat shock protein (HSP)-72 in ischemic brain. *Metab Brain Dis*. 10(4):283-91. 1995.
- Kurucz I, Morva A, Vaag A, Eriksson KF, Huang X, Groop L, Koranyi L. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes*. v.51, p.1102-09. 2002.

- Lacoste A, De Cian MC, Cueff A, Poulet AS. Noradrenaline and α -adrenergic signaling induce the hsp70 gene promoter in mollusc immune cells. *J Cell Science*. 114, 3557-3564. 2001.
- Lam TKT, Gutierrez J R, Pocai A, Rossetti L. Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science*. 309, 943–947. 2005.
- Lam CKL, Chari M, Wang PYT, Lam TKT. Central lactate metabolism regulates food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 295: E491–E496. 2008.
- Lam CKL, Chari M, Lam TKT. CNS regulation of glucose homeostasis. *Physiology*. 24: 159–170. 2009.
- Lancaster GI, Moller K, Nielsen B, Secher NH, Febbraio MA & Nybo L. Exercise induces the release of heat shock protein 72 from the human brain in vivo. *Cell Stress Chaperones* 9, 276-280. 2004.
- Lanks KW, Hitti IF, Chin NW. Substrate utilization for lactate and energy production by heat-shocked L929 cells. *J Cell Physiol*. 127(3):451-6. 1986.
- Lauritzen KH, Morland C, Puchades M, Holm-Hansen S, Hagelin EM, Lauritzen F, Attramadal H, Storm-Mathisen J, Gjedde A, Bergersen LH. Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism. *Cerebral Cortex*. 2013.
- Lee DA, Bedont JL, Pak T, Wang H, Song J, Angulo AM, Takiar V, Charubhumi V, Balordi F, Takebayashi H, Aja S, Ford E, Fishell G, Blackshaw S. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci*. 2012.
- Lee HB, Blaurock MD. Blood Volume in the Rat. *J Nucl Med*. 25:72-76, 1985.
- Lee JE; Yenari MA; Sun GH; Xu L; Emond MR; Cheng D; Steinberg GK; Giffard RG. Differential neuroprotection from human heat shock protein 70: Overexpression in *in vitro* and *in vivo* models of ischemia and ischemia-like conditions. *Exp Neurology* 170, 129–139. 2001.

- Levin BE, Dunn-Meynell AA, Routh VH. Brain glucose sensing and body energy homeostasis: Role in obesity and diabetes. *Am. J. Physiol.* 276. 1999.
- Levinson W, Oppermann H, Jackson J. Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta.* 606(1):170-80. 1980.
- Liebelt B; Papapetrou P; Ali A; Guo M, Ji X; Peng C; Rogers R; Curry A; Jimenez D; Ding Y. Exercise preconditioning reduces neuronal apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated-kinase 1/2. *Neuroscience.* 166 , 1091–1100. 2010.
- Lindquist S & Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* **22**, 631-677. 1998.
- Liu Y, Mayr S, Opitz-Gress A, Zeller C, Lormes W, Baur S, Lehmann M, Steinacker JM. Human skeletal muscle HSP70 response to training in highly trained rowers. *J Appl Physiol.* 86, 101. 1999.
- Liu Y, Lormes W, Baur C, Opitz-Gress A, Altenburg D, Lehmann M, Steinacker JM. Human skeletal muscle HSP70 response to physical training depends on exercise intensity. *J Appl Physiol.* 21, 351. 2000.
- Liu Y, Lormes W, Wang L, Reissnecker S, Steinacker JM. Different skeletal muscle HSP70 responses to high-intensity strength training and low-intensity endurance training. *Eur J Appl Physiol*, 91: 330–335. 2004.
- Loones MT, Chang Y, Morange M. The distribution of heat shock proteins in the nervous system of the unstressed mouse embryo suggests a role in neuronal and non-neuronal differentiation. *Cell Stress & Chaperones.* 5 (4), 291–305. 2000.
- Matsui T, Soya S, Okamoto M, Ichtani Y, Kawanaka K, Soya H. Brain glycogen decreases during prolonged exercise. *J Physiol.* 1;589:3383-93. 2011.

- Matsui T, Ishikawa T, Ito H, Okamoto M, Inoue K, Lee M, Fujikawa T, Ichitani Y, Kawanaka K; Soya H. Brain glycogen supercompensation following exhaustive exercise. *J Physiol* .590.3, pp 607–616. 2012.
- Matschinsky FM, Magnuson MA, Zelent D, Jetton TL, Doliba N, Han Y, Taub R, Grimsby J. The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes*. 55, 1-12. 2006.
- Matsumori Y, Northington FJ, Hong SM, Kayama T, Sheldon RA, Vexler ZS, Ferriero DM, Weinstein PR, Liu J. Reduction of caspase-8 and -9 cleavage is associated with increased c-FLIP and increased binding of Apaf-1 and Hsp70 after neonatal hypoxic/ischemic injury in mice overexpressing Hsp70. *Stroke*, 37:507–512. 2006.
- Melling CWJ; Thorp DB; Milne KJ; Krause MP; Noble EG. Exercise-mediated regulation of Hsp70 expression following aerobic exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H3692–H3698, 2007.
- Meng Q, Cai D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I κ B kinase β (IKK β)/NF- κ B pathway. *J Biol Chem*. Vol. 286, NO. 37, pp. 32324–32332. 2011.
- Miller BF, Fattor JA, Jacobs KA, Horning MA, Navazio F, Lindinger MI, Brooks GA. Lactate and glucose interactions during rest and exercise in men: effect of exogenous lactate infusion. *J Physiol*. 544.3, pp. 963–975. 2002.
- Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carvalheira JB, Oliveira ALR, Saad MJ, Velloso LA. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *Plos one*. Volume 4. Issue 4. 2009.
- Morrison BM, Pardue S, McIntire DD, Miller EK. Cell size and the heat-shock response in rat brain. *J Neurochem*. 63(3):857-67. 1994.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. Vol 443. 2006.

- Morton GJ, Schwartz MW. Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev.* 91: 389–411. 2011.
- Mountjoy PD, Rutter GA. Glucose sensing by hypothalamic neurones and pancreatic islet cells: AMPle evidence for common mechanisms? *Exp Physiol.* 92.2, pp 311–319. 2006.
- Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. Ed.Artmed. 5ª edição. 2011.
- Newsholme EA, Leach AR. Biochemistry for the medical sciences. Ed.Wiley. 1983.
- Nishimura RN, Dwyer BE. Evidence for different mechanisms of induction of HSP70i: a comparison of cultured rat cortical neurons with astrocytes. *Mol Brain Res.* 36 227-239. 1996.
- Noble EG, Milne KJ & Melling CW. Heat shock proteins and exercise: a primer. *Appl Physiol Nutr Metab* 33, 1050-1065. 2008.
- Odeleye OE, de Court Pettitt DJ, Ravussin E. Fasting hyperinsulinemia is a predictor of increased body weight gain and obesity in Pima Indian children. *Diabetes.* 46, 1341–1345. 1997.
- Ohtsuka, K, Suzuki, T. Role of molecular chaperones in the nervous system. *Brain Res Bulletin* 5, 141-146. 2000.
- Oomura Y, Kimura K, Ooyama H, Maeo T, Iki M, Kuniyoshi N. Reciprocal activities of the ventromedial and lateral hypothalamic area of cats. *Science.* 143:484 – 5. 1964.
- Orosz, A, Benjamin IJ. Genetic models of HSF function. In: *Stuart K. Calderwood, Protein Reviews, Volume 7: Cell Stress Proteins - Edited*, v.1, cap.5, Ed. Springer. 2007.
- Parolin ML, Chesley A, Matsos MP, Spriet LL, Jones NL, Heigenhauser GJ. Regulation of skeletal muscle glycogen phosphorylase and PDH during maximal intermittent exercise. *Am. J. Physiol.* 277, E890–E900. 1999.
- Pavilik A, Aneja I S, Lexa J, Al-Zoabi B A. Identification of cerebral neurons and glial cell types inducing heat shock protein Hsp70 following heat stress in the rat. *Brain Res.* v.973, p.179-189. 2003.

- Paxinos G, Watson C. The Rat Brain. In Steriotaxic Coordinates. Ed. Elsevier. Sexta edição. 2009.
- Pelerrin, L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serrer S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: An update. *Glia*. 55:1251–1262. 2007.
- Pellerin L, Magistretti PJ. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Metab Blood Flow*. 1-15. 2011.
- Peters A, Schweiger U, Pellerin L, Hubold C, Oltmanns KM, Conrad M, Schultes B, Born J, Fehm HL. The selfish brain: competition for energy resources. *Neurosci Biobehav Rev*. 28, 143–180. 2004.
- Peters A, Pellerin L, Dallman MF, Oltmanns KM, Schweiger U, Born J, Fehm HL. Causes of obesity: Looking beyond the hypothalamus. *Prog Neurobiol*. 81, 61–88. 2007.
- Rao A, Steward O. Evidence that protein constituents of postsynaptic membrane specializations are locally synthesized: Analysis of proteins synthesized within synaptosomes. *J. Neurosci*. 11:2881–2895. 1991.
- Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*.18: 571-573. 1962.
- Robinson MB, Tidwell JL, Gould T, Taylor, AR, Newbern JM, Graves J, Tytell M, Milligan CE. Extracellular Heat Shock Protein 70: A critical component for motoneuron survival. *J Neurosci*, 25(42):9735–9745. 2005.
- Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, Rocha GZ, Pauli JR, Morari J, Souza CT, Moraes JC, Prada OP, Guadagnini D, Marin RM, Oliveira AG, Augusto TM, Carvalho HF, Velloso LA, Saad MJA, Carvalheira JBC. IL-6 and IL-10 Anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKb and ER stress inhibition. *Plos biol* .Volume 8. Issue 8. 2006.
- Routh VH. Glucose-sensing neurons: Are they physiologically relevant? *Physiol Behav*. 76. 403 – 413. 2002.

- Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 434, 1026-1031. 2005.
- Sheller RA, Smyers ME, Grossfeld RM, Ballinger M, Bittner GD. Heat-shock proteins in axoplasm: High constitutive levels and transfer of inducible isoforms from glia. *J Comp Neurol*. 396:1–11. 1998.
- Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med*. 341, 248–257. 1999.
- Shimizu N, Oomura Y, Novin D, Grijalva CV, Cooper PH. Functional correlations between lateral hypothalamic glucose-sensitive neurons and hepatic portal glucose-sensitive units in rat. *Brain Res*. 265:49 – 54. 1983.
- Sigal RJ, el Hashimy M, Martin BC, Soeldner JS, Krolewski AS, Warram JH. Acute postchallenge hyperinsulinemia predicts weight gain: a prospective study. *Diabetes*. 46, 1025–1029. 1997.
- Skidmore R, Gutierrez JA, Guerriero V, Jr. & Kregel KC. HSP70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. *Am J Physiol* 268, R92-97. 1995.
- Smolka MB, Zoppi CC, Alves AA, Silveira LR, Marangoni S, Pereira-Da-Silva L, Novello JC & Macedo DV. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R1539-1545. 2000.
- Swinburn BA, Nyomba BL, Saad MF, Zurlo F, Raz I, Knowler WC, Lillioja S, Bogardus C, Ravussin E. Insulin resistance associated with lower rates of weight gain in Pima Indians. *J. Clin. Invest*. 88, 168–173. 1991.
- Silveira, EM, Rodrigues MF, Krause MS, Vianna DR, Almeida BS, Rossato JS, Oliveira LP Jr, Curi R, de Bittencourt PI Jr. Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NFkappaB pathways. *Cell Biochem Funct*, v.25, n.1, Jan-Feb, p.63-73. 2006.

- Song I, Kamboj S, Xia J, Dong H, Liao D, Huganir RL. Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron*. 21:393–400. 1998.
- Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJA, LA Velloso. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinol*. 146(10):4192–4199. 2005.
- Soya H, Mukai A, Deocaris CC, Ohiwa N, Chang H, Nishijima T, Fujikawa T, Togashi K, Saito T. Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: Establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. *Neurosci Res*. 58, 341–348. 2007.
- Tang F, Lane S, Korsic A, Paton JFR, A.V. Gourine, Kasparov S, Teschemacher AG. Lactate-mediated glia-neuronal signaling in the mammalian brain. *Nat Commun*. 5:3284. 2014.
- Taylor DM, de Koninck P, Minotti S, Durham HD. Manipulation of protein kinases reveals different mechanisms for upregulation of heat shock proteins in motor neurons and non-neuronal cells. *Mol. Cell. Neurosci*. 34. 20–33. 2007a.
- Taylor A R, Robinson M B, Gifondorwa D J, Tytell M, Lilligan C E. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: Role of signaling kinases. *Develop Neurobiol*. 10.1002, p.1815-1829. 2007b.
- Thaler J P, Yi C X, Schur E A, Guyenet S J, Hwang B H, Dietrich M O, Zhao X, Sarruf D A, Izgur V, Maravilha K R, Nguyen H T, Fischer J D, Matsen M E, Wisse B E, Morton G J, Horvath T L, Baskin D G, Tschöp M H, Schwartz M W. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest*. 10.1172, p.1-10. 2011.
- Tiedge H, Brosius J. Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci*. 16:7171–7181. 1996.
- Tytell, M, Greenberg SG, Lasek RJ. Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. *Brain Res*. 363:161–164. 1986.

- Tytell M, Barbe MF. Synthesis and axonal transport of heat shock proteins. In M.A. Bisby and R.S. Smith (eds): Axonal Transport. New York: Alan R. Liss, Inc., pp. 473–492. 1987.
- Vogt M, Puntschart A, Geiser, J, Zuleger C, Zuleger C, Billeter R, Hoppeler H. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol.* 91: 173–182. 2001.
- Walters TJ, Ryan KL, Tehrany MR, Jones MB, Paulus LA, Mason PA. HSP70 expression in the CNS in response to exercise and heat stress in rats. *J Appl Physiol.* 84, 1269-1277. 1998.
- Wang L, Dong Y, Yu X, Shangguan DH, Zhao R, Han HW. Liu GQ. Analysis of glucose and lactate in dialysate from hypothalamus of rats after exhausting swimming using microdialysis. *Biome. Chromatogr.* 16: 427–431. 2002.
- Whitham M, Laing SJ, Jackson A, Maassen N, Walsh NP. Effect of exercise with and without a thermal clamp on the plasma heat shock protein 72 response. *J Appl Physiol.* 103: 1251–1256. 2007.
- Xin L, Yangl J, Jiang H, Panf. Swimming exercise effects on the expression of HSP70 and iNOS in hippocampus and prefrontal cortex in combined stress. *J Neulet.* 04.011, p. 99-103. 2010.
- Xu L, Giffard RG. HSP70 protects murine astrocytes from glucose deprivation injury *Neurosci Lett.* 224, 9–12. 1997.
- Zorzano A, Palacin M, Guma A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 183, 43–58. 2005.

8. ANEXO 1

Carta de aprovação do comitê de ética:

	U F R G S UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 21082
Título: EXPRESSÃO DE HSP70 NO HIPOTÁLAMO DE RATOS APÓS EXERCÍCIO AGUDO E TREINAMENTO DE DIFERENTES INTENSIDADES E SEUS MECANISMOS

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

DENISE MARIA ZANCAN - coordenador desde 01/06/2012
PAULO IVO HOMEM DE BITTENCOURT JUNIOR - coordenador desde 01/06/2012
Rossana Rosa Porto - Aluno de Mestrado desde 01/06/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 288 ratos, Wistar, machos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 3 de Outubro de 2012



FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética