

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

NÍVEIS PLASMÁTICOS DE EHSP70 E VOLUME LINFOCITÁRIO CIRCULANTE COMO BIOMARCADOR DE ESTADO IMUNOLÓGICO APÓS TREINAMENTO FÍSICO EM RATOS¹

Luana Weizenmann², Analú Bender Dos Santos³, Matias Nunes Frizzo⁴, Thiago Gomes Heck⁵, Mirna Stela Ludwig⁶, Fernanda Giesel Baldissera⁷.

¹ Pesquisa Institucional desenvolvida do Departamento de Ciências da Vida, pertencente ao grupo de pesquisa em fisiologia no curso de mestrado em atenção integral a saúde da Unijuí

² Luana Weizenmann, Acadêmica do curso de Fisioterapia - UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, e-mail: luanaweizenmann@hotmail.com

³ Analú Bender dos Santos, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Mestranda Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS) UNIJUI/UNICRUZ

⁴ Matias Nunes Frizzo, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Professor do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI

⁵ Thiago Gomes Heck, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI)

⁶ Mirna Stela Ludwig, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI)

⁷ Fernanda Giesel Baldissera, Doutoranda em Ciências da Saúde - UFCSPA, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

INTRODUÇÃO

O exercício físico desencadeia muitas alterações fisiológicas no organismo em variáveis, como temperatura, pH, concentração iônica, consumo de oxigênio e glicogênio, e diminuição de ATP intracelular. Além disso, dependendo da intensidade do esforço realizado, o exercício pode ser capaz de aprimorar o sistema imunológico ou deixá-lo mais vulnerável, fenômeno conhecido como “janela aberta imunológica” (Gleeson et al., 2013)

Foi demonstrado que, após a prática de exercício físico, pode ocorrer o aumento da expressão de proteínas de choque térmico, especialmente de 70 kDa (HSP70) em muitos tecidos, de forma dependente da intensidade (Milne e Noble, 2002; Noble et al., 2008). Esta proteína apresenta ação chaperona citoprotetora intracelular e anti-inflamatória, essencial para a manutenção da homeostase proteica e celular sob condições fisiológicas e de estresse.

Sob condições de estresse, inclusive durante/após o exercício físico, a HSP70 intracelular, particularmente a HSP72, pode ser liberada por muitos tipos celulares e ser encontrada circulante no meio extracelular (eHSP72) (Hunter-Lavin et al., 2004; Ireland et al., 2007; Heck, 2010; Heck et al., 2011), onde atua como potente “chaperocina”, promovendo efeitos celulares regulatórios, especialmente em células imunológicas, como sinalização celular em respostas inflamatórias e imunológicas (Asea, 2006; 2007).

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

Neste contexto, o exercício físico pode, via liberação de eHSP72 ter efeitos imunomoduladores. Além disso, as próprias células imunológicas circulantes são exportadoras de eHSP72 em resposta ao exercício (Heck et al., 2011). Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar uma possível relação entre o conteúdo plasmático de eHSP72 e a concentração de leucócitos circulantes em modelo animal, após 12 semanas de exercício físico sob diferentes intensidades (moderada e intensa).

METODOLOGIA

O projeto de pesquisa foi encaminhado e submetido à Comissão de Ética para Uso de Animais-CEUA, da UNIJUI no ano de 2013.

Animais

Foram utilizados neste estudo 16 camundongos B6129SF2/J (B6) com 21 dias, machos, provenientes do biotério da UNIJUI, com controle da temperatura ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (50 a 60%), ciclo claro/escuro de 12 horas; recebendo água potável ad libitum.

Grupos experimentais

Foram utilizados 16 camundongos B6129SF2/J (B6), onde foram colocados nos seguintes grupos de acordo com o tratamento. No grupo controle (C), treinado moderado (T4%) e treinado intenso (T8%) foram utilizados 6,5 e 5 camundongos, consecutivamente.

Protocolo de Exercício Físico

Os animais foram divididos entre repouso e treinados, subdivididos em intensidade moderada 4% e intensa 8%, adaptados em meio líquido na temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, onde realizaram treinamento durante os cinco dias da semana, durante 12 semanas. Os animais que realizaram treinamento físico de intensidade moderada (T4%) de natação iniciaram o esforço com duração de 20 minutos na 1ª semana, sem adição de carga. Da 2ª a 5ª semana os animais receberam cargas acopladas à base de sua calda, iniciando em 1% (carga equivalente ao seu peso corporal), atingindo 4% na 5ª semana. Ao atingir a carga de trabalho 4%, houve um acréscimo de 10 minutos no volume de treinamento, até atingir 60 minutos na 9ª semana, permanecendo com essa duração de esforço até a 12ª semana. Este protocolo representa uma intensidade moderada de esforço (HECK, 2011) e tem suas cargas relativas inalteradas (em 4%). Os animais que realizaram treinamento físico de intensidade intensa (T8%) de natação realizaram seu treinamento com as mesmas cargas e tempos de natação do grupo T4% até a 5ª semana. Porém continuaram a incrementar sua carga de trabalho, 1%/semana, até atingir 8% na 9ª semana de treinamento. Permanecendo com a duração de 20 minutos e intensidade de esforço de 8% até a 12ª semana. Este protocolo representa uma alta intensidade de esforço (Heck, 2011). As cargas relativas mantiveram-se inalterada em 4 ou 8%, mas sua carga absoluta foi modificada em relação ao peso corporal do animal que estava em desenvolvimento. O grupo sedentário C, foi mantido durante o mesmo período de tempo (12 semanas) em um recipiente com 2 centímetros de água (temperatura da água = $30^{\circ}\text{C}+1^{\circ}\text{C}$).

Contagem de leucócitos

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

O sangue foi acondicionado em tubo com anticoagulante (5µl de EDTA, para cada 500 µl de sangue) para determinação dos parâmetros hematológicos. Para a determinação automatizada foi utilizado o analisador hematológico Micros 60 (Horiba), seguindo as recomendações do fabricante. Através desse equipamento é possível obter a contagem total de leucócitos. As amostras foram diluídas 1:2 com solução salina 0,9 % e realizadas em triplicata. Após, foram realizadas distensões hematológicas em lâmina, corados com coloração panótica (Newprov) e analisadas por profissional com experiência na área, para cada lâmina uma contagem de 100 células.

Expressão de HSP70

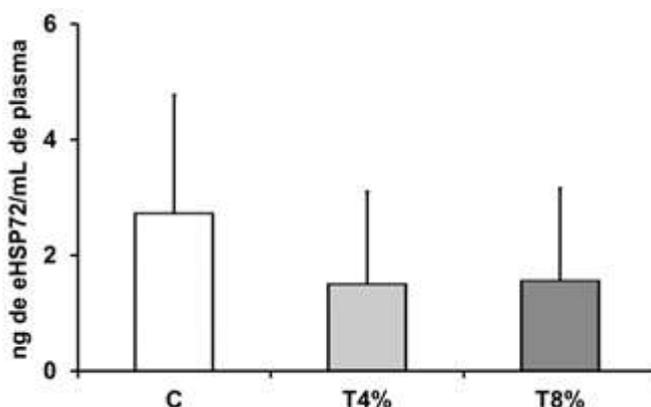
Foram analisadas expressões de HSP70 em homogeneizados de plasma e nos leucócitos, por Western Blotting, eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970), com o uso de anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147), diluído 1:1000, com segundo anticorpo contendo peroxidase (Sigma A9044) diluído 1:10.000. A imunodeteção será realizada utilizando o aparelho Snap Id (MILLIPORE) e a revelação ocorrerá em sala escura com uso de fluorescência pelo método do luminol e ácido p-coumárico (Heck, 2011).

Análise Estatística

Para o tratamento estatístico os dados foram expressos em média \pm desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de teste post-hoc de Tukey, e Correlação de Pearson, considerando nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os animais que foram submetidos a natação por 12 semanas sob intensidade moderada (T4%) apresentaram redução de apenas 20% na concentração plasmática de leucócitos, e redução de 45% no conteúdo plasmático de eHSP72, quando comparados ao grupo controle. Já os animais que realizaram exercício físico pelo mesmo período, porém sob alta intensidade (T8%), demonstraram redução de 48% na concentração plasmática de leucócitos, e redução de 43% no conteúdo plasmático de eHSP72, também quando comparados ao grupo controle.



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

Gráfico 1. Conteúdo plasmático de eHSP72. Os dados são expressos em média \pm desvio-padrão. Grupo controle (C), n = 6; grupo intensidade moderada (T4%), n = 5; grupo intensidade alta (T8%), n = 4. ANOVA, P = 0.5563.

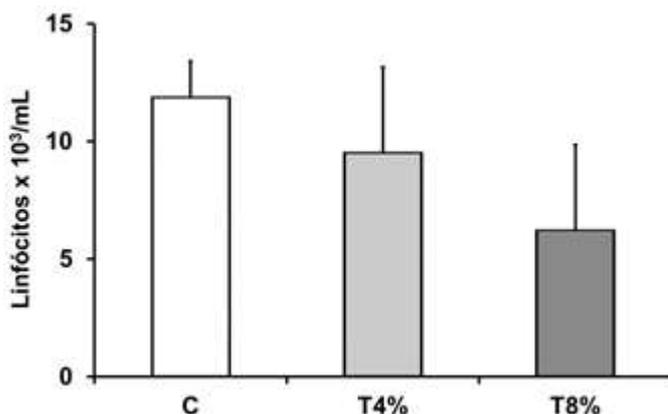


Gráfico 2. Concentração plasmática de linfócitos. Os dados são expressos em média \pm desvio-padrão. Grupo controle (C), n = 6; grupo intensidade moderada (T4%), n = 5; grupo intensidade alta (T8%), n = 4. ANOVA, P = 0.0742

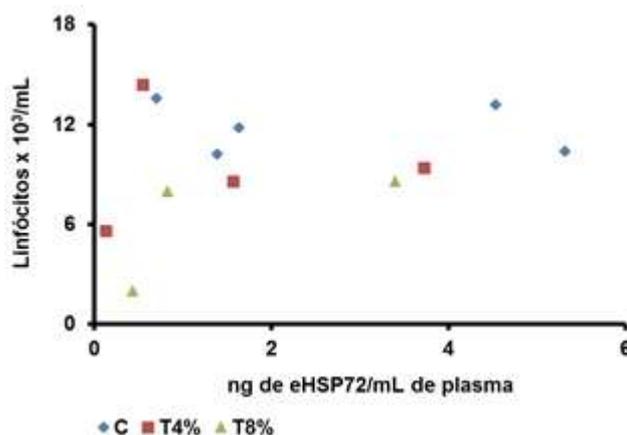


Gráfico 3. Correlação entre os conteúdos plasmáticos de linfócitos e eHSP72. Os dados são expressos em média \pm desvio-padrão. Grupo controle (C), n = 6; grupo intensidade moderada (T4%), n = 5; grupo intensidade alta (T8%), n = 4. Correlação de Pearson, C: P = 0.7451; T4%: P = 0.9774; T8%: P = 0.5372.

DISCUSSÃO

Este trabalho é um recorte de um estudo mais amplo, sendo baseado em dados preliminares. De acordo com os resultados apresentados neste estudo, apesar de não termos encontrado diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (controle e treinamentos a 4% e 8%),

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

podemos sugerir que há indicativos de uma relação entre a diminuição na contagem de linfócitos e concentração plasmática de eHSP72.

De acordo com Hunter-Lavin (2004), linfócitos liberam continuamente HSP70 para a circulação e condições de estresse resultam em rápido e acentuado aumento desta liberação (Hunter-Lavin et al., 2004). Além disso, Heck e colaboradores (2011) demonstraram que linfócitos isolados de linfonodos de ratos submetidos agudamente ao exercício intenso (T8%), quando expostos ao choque térmico (42 °C), apresentaram maior exportação de HSP70 que estas células de animais que não nadaram ou nadaram sob intensidade moderada (T4%). Estes estudos citados corroboram para a interpretação dos dados desta pesquisa.

Os leucócitos são essenciais para a resposta imunológica eficaz. A diminuição da concentração deste tipo celular sanguíneo, especialmente quando associado a diminuição de eHSP72 (esta proteína extracelular atua como imunomodulador), pode representar um prejuízo importante na resposta imunológica e, conseqüentemente, na capacidade do indivíduo em responder às possíveis agressões e adversidades do ambiente.

O exercício físico consiste num meio prático e viável de tratamento coadjuvante ou de prevenção de muitas doenças. Porém, não existem marcadores para o ponto ótimo de carga de exercício para que esse objetivo seja atingido. Ou seja, não se tem ainda um marcador imunológico que possa aferir os ganhos proporcionados por uma determinada carga (energia) de exercício (Heck, 2011). Neste sentido, os níveis de eHSP70 circulante apresentam-se como possíveis imunomoduladores-chave durante o exercício, estando provavelmente correlacionados com a concentração linfocitária circulante.

CONCLUSÃO

Os dados resultantes deste trabalho sugerem que o conteúdo plasmático de eHSP70 pode estar diretamente correlacionado com a concentração linfocitária circulante após exercício físico. Este resultado é um indicativo do potencial da HSP70 como biomarcador do quadro imunológico após treinamento físico.

Entretanto, mais estudos devem ser realizados, aumentando o número de amostras, obtendo resultados mais significativos.

Referencias

- Asea, A. Initiation of the Immune Response by Extracellular Hsp72: Chaperokine Activity of Hsp72. *Curr Immunol Rev*, v.2, n.3, Aug, p.209-215. 2006.
- _____. Mechanisms of HSP72 release. *J Biosci*, v.32, n.3, Apr, p.579-584. 2007.
- Gleeson, M., ; N. Bishop, ;, et al. *Exercise Immunology* Routledge. 2013
- Heck, T. A HSP70 como fator imunomodulador do exercício físico. XXV Reunião Anual das Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. Aguas de Lindóia, 2010. p.
- Heck, T. G. Razão entre o conteúdo extracelular e intracelular de hsp70 como um sinal de alerta imunológico e marcador de intensidade de exercício. Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. 154 p.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

Heck, T. G., C. M. Scholer, et al. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? Cell Biochem Funct, v.29, n.3, Apr, p.215-226. 2011.

Hunter-Lavin, C., E. L. Davies, et al. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. Biochem Biophys Res Commun, v.324, n.2, Nov 12, p.511-517. 2004.

Ireland, H. E., F. Leoni, et al. Measuring the secretion of heat shock proteins from cells. Methods, v.43, n.3, Nov, p.176-183. 2007.

Milne, K. J. e E. G. Noble. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. J Appl Physiol, v.93, n.2, Aug, p.561-568. 2002.

Noble, E. G., K. J. Milne, et al. Heat shock proteins and exercise: a primer. Appl Physiol Nutr Metab, v.33, n.5, Oct, p.1050-1065. 2008.

￼