

TÁBATA LEAL NASCIMENTO

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

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

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Profª Dra. Elen Haruka Miyabara

Versão original

São Paulo
2012

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do tecido muscular esquelético

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Plasticidade do músculo esquelético

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

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

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

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

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

1.3 Células Satélites

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

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

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

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

1.4 Atrofia do músculo esquelético

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

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

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

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

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

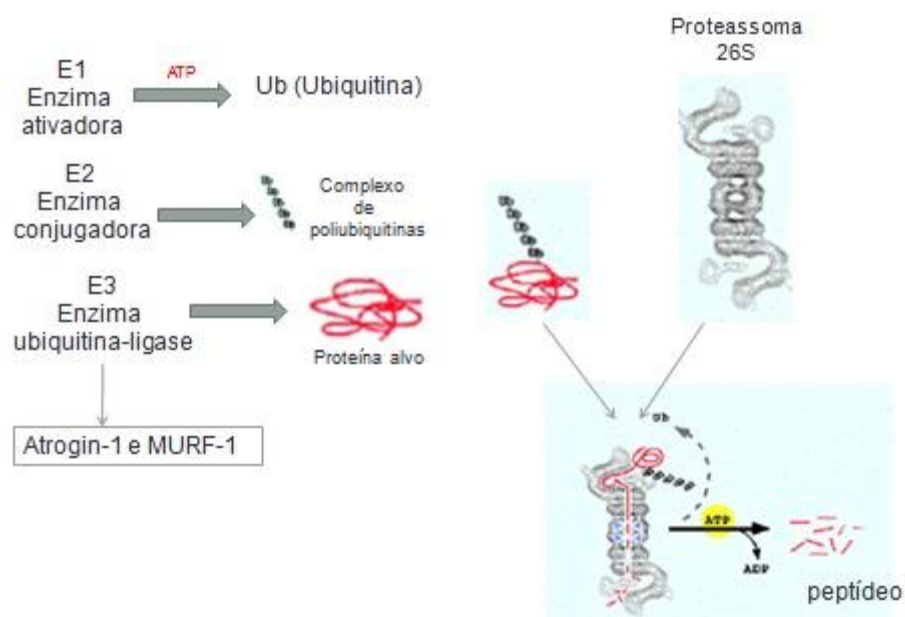
Estudos têm demonstrado que em situação de atrofia muscular ocorre inibição de IGF-I que é o principal indutor da via de síntese proteica Akt/mTOR, e concomitantemente com a diminuição da síntese proteica há o aumento da degradação proteica (Jackman, Kandarian, 2004; Kandarian, Jackman, 2006). São conhecidas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

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

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

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

Figura 1 - Via ubiquitina-proteassoma.



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

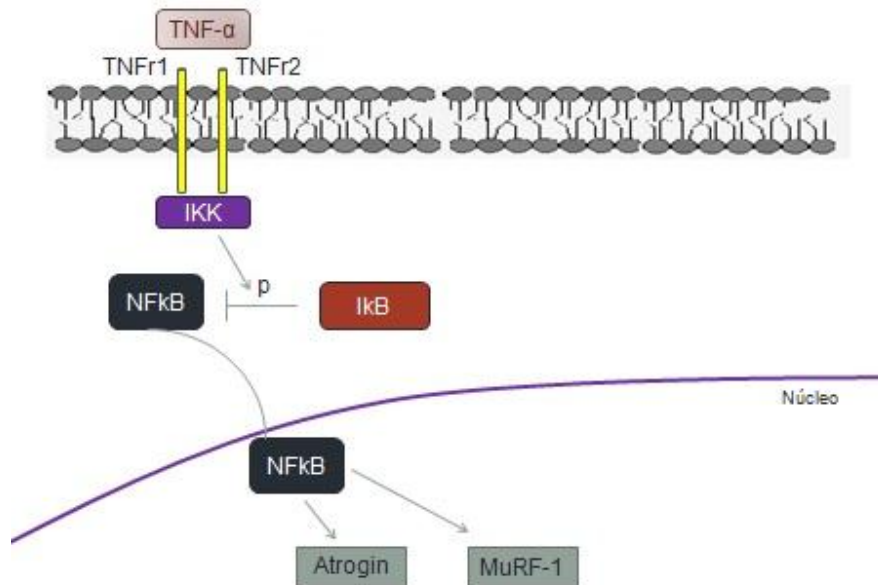
Fonte: Adaptado de Murton et al. (2008).

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

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

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

Figura 2 - Via do NF- κ B.



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

Fonte: Adaptado de Bakkar e Guttridge (2010).

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

1.5 Características gerais das HSPs

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

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

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

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

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

1.6 HSP70 no músculo esquelético

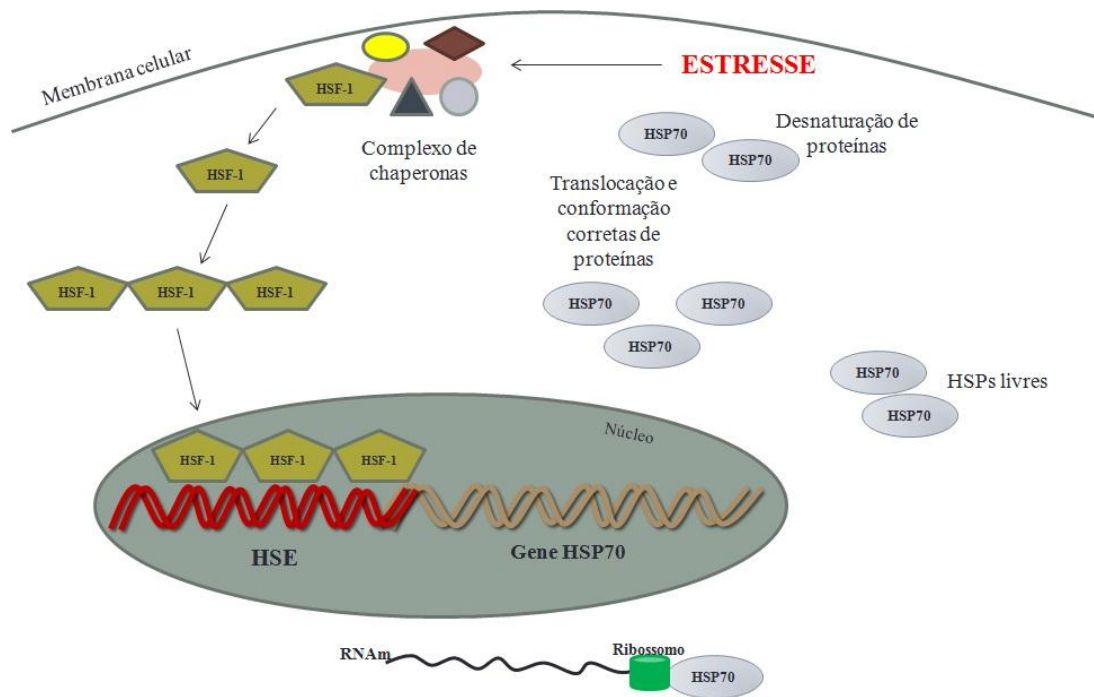
A família da HSP70 é composta de quatro formas; a 72 kDa, a 73 kDa, a 75 kDa e a 78 kDa. As proteínas com maior peso molecular, 75 kDa e 78 kDa, são conhecidas como GRP75 e GRP78 e são induzidas por privação de glicose, influxo de cálcio ou agentes que interferem na glicólise, mas não por estresse térmico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

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

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

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

Figura 3 - Via de síntese da HSP70.



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

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

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

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

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

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

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

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

1.7 Justificativa e Relevância do estudo

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

6 CONCLUSÃO

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

REFERENCIAS¹

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

¹ De acordo com:

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

- Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Des.* 2010;16(8):906-14.
- Clark KA, Mcelhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:637-706.
- Collins PL, Hightower LE. Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat shock) mRNAs and proteins. *J Virol.* 1982;44(2):703-7.
- Cornelison DD, Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol.* 1997;191(2):270-83.
- Covault J, Sanes JR. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1986;102(3):716-30.
- Dahlman JM, Bakkar N, He W, Guttridge DC. NF-kappaB functions in stromal fibroblasts to regulate early postnatal muscle development. *J Biol Chem.* 2010;285(8):5479-87.
- Darr KC, Schultz E. Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation. *J Appl Physiol.* 1989;67(5):1827-34.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997;324 (Pt 1):1-18.
- Dedkov EI, Borisov AB, Wernig A, Carlson BM. Aging of skeletal muscle does not affect the response of satellite cells to denervation. *J Histochem Cytochem.* 2003;51(7):853-63.
- Edelman DA, Jiang Y, Tyburski JG, Wilson RF, Steffes CP. Lipopolysaccharide Up-Regulates Heat Shock Protein Expression in Rat Lung Pericytes. *Journal of Surgical Research.* 2006;10.1016(.12.560):171-6.
- Feldman DE, Frydman J. Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. *Curr Opin Struct Biol.* 2000;10(1):26-33.
- Ferreira R, Neuparth MJ, Vitorino R, Appell HJ, Amado F, Duarte JA. Evidences of apoptosis during the early phases of soleus muscle atrophy in hindlimb suspended mice. *Physiol Res.* 2008;57(4):601-11.
- Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Leger B, Russell AP. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch.* 2011;461(3):325-35.
- Freitas EM, Dal MPS, Cruz-Hofling MA Da. Histochemical differences in the responses of predominantly fast-twitch glycolytic muscle and slow-twitch oxidative muscle to veratrine. *Toxicol.* 2002;40(10):1471-81.
- Gebauer M, Zeiner M, Gehring U. Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects on refolding activity. *FEBS Lett.* 1997; 417(1):109-13.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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