



**UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA  
UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE  
DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM  
ATENÇÃO INTEGRAL À SAÚDE**

**EFEITO DA TERAPIA DE CHOQUE TÉRMICO SOBRE PARÂMETROS  
BIOMÉTRICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE CELULAR,  
EM RATAS WISTAR OVARIECTOMIZADAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**YANA PICININ SANDRI LISSARASSA**

**IJUÍ-RS, Brasil 2016**

**EFEITO DA TERAPIA DE CHOQUE TÉRMICO SOBRE PARÂMETROS  
BIOMÉTRICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE CELULAR,  
EM RATAS WISTAR OVARIECTOMIZADAS**

Por  
YANA PICININ SANDRI LISSARASSA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde. Programa em rede entre a Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ, RS), e a Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Atenção Integral à Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirna Stela Ludwig  
Co-Orientador: Prof. Dr. Thiago Gomes Heck

Ijuí-RS, Brasil  
2016

Catálogo na Publicação

L772e Lissarassa, Yana Picinin Sandri.  
Efeito da terapia de choque térmico sobre parâmetros biométricos, hematológicos, bioquímicos e de estresse celular, em ratas wistar ovariectomizadas / Yana Picinin Sandri Lissarassa. – Ijuí, 2016.  
123f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (Campus Ijuí). Atenção Integral à Saúde.

"Orientadora: Mirna Stela Ludwig."  
"Co-orientador: Thiago Gomes Heck."

1. Terapia de choque térmico. 2. Estresse oxidativo. 3. Colesterolemia  
4. Ovariectomia. 5. HSP70. I. Ludwig, Mirna Stela. II. Heck, Thiago Gomes. III. Título.

CDU: 615.832

Gislaine Nunes dos Santos  
CRB10/1845

UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA E UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE  
DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ATENÇÃO INTEGRAL  
À SAÚDE

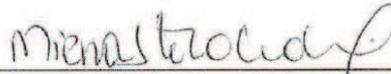
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DA TERAPIA DE CHOQUE TÉRMICO SOBRE  
PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E  
DE ESTRESSE CELULAR, EM RATAS WISTAR  
OVARIETOMIZADAS**

elaborada por:

**YANA PICININ SANDRI LISSARASSA**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Atenção Integral à Saúde**

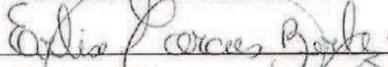


Prof.ª. Dr.ª. Mirna Stela Ludwig  
(Orientadora)

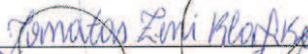


Prof. Dr. Thiago Gomes Heck  
(Coorientador)

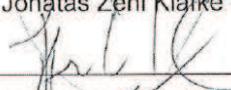
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.ª. Dr.ª. Evelise Moraes Berlezi - (UNIJUI)



Prof. Dr. Jonatas Zeni Klafke - (UNICRUZ)



Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.- (UFRGS)

Ijuí, 09 de setembro de 2016

**A meus pais, Eloísa e Delmar,  
pelo amor e imenso incentivo ao estudo.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela fé.

A meus pais pela vida e por me ensinarem o valor de estudar sempre.

A meu esposo Luiz Fernando pelo amor, incentivo e companheirismo em todos os momentos.

A minha irmã Amanda pelo estímulo e por sermos pilar, uma da outra.

Aos meus sogros, Joice e Cinésio pelo apoio e amizade.

A minha orientadora Mirna Stela Ludwig, por acreditar em meu potencial, pelos incentivos, carinho e pelos inúmeros ensinamentos nessa caminhada.

Ao meu co-orientador Thiago Gomes Heck, pelas constantes colaborações.

A todos os colegas que integram o Grupo de Pesquisa em Fisiologia, pela ajuda, ensinamentos, colaboração, companhia, empenho ou simplesmente por me fazerem sorrir nas horas mais pesadas. Em especial os colegas Guilherme, Jaíne, Maicon, Marcos e Pauline.

As minhas colegas e amigas especiais Carolain e Analú, pela ajuda, por acreditarem nesse trabalho, pelo empenho, pela companhia, pelas viagens quase que diárias, por simplesmente termos formado o “trio do choque térmico”.

Aos grandes amigos e colegas que sempre acreditaram em mim, Emanuelle Kerber Viera e Matias Nunes Frizzo

Ao IESA por disponibilizar a realização de algumas análises e flexibilizar meus horários.

A UNIJUÍ, por meio do Laboratório de Ensaio Biológicos, pela realização deste trabalho.

A todos que de uma maneira ou outra ajudaram na realização e conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada.

## RESUMO

O organismo feminino, na falta de estrogênio, está sujeito a estresse metabólico, o que eleva o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Além disso, a resposta celular ao estresse, a citoproteção e a ação anti-inflamatória, mediadas pela expressão de proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70), podem estar prejudicadas na ausência de estrogênio. Neste estudo avaliou-se o efeito da terapia de choque térmico sobre os parâmetros biométricos, hematológicos e bioquímicos, estado redox e a concentração intra e extracelular de HSP70, em ratas Wistar adultas ovariectomizadas. Foram utilizadas 32 ratas Wistar, com 5 meses de idade ( $\pm 200$ g), provenientes do biotério da UNIJUI (CEUA/UNIJUI, Parecer nº 003/2015). Os animais foram divididos em 4 grupos: C (controle) e TCT (terapia de choque térmico), ambos submetidos à falsa cirurgia; OVX (ovariectomia) e OVX + TCT (ovariectomia + terapia de choque térmico), submetidas à ovariectomia. Os grupos C e OVX foram mantidos em normotermia e os grupos TCT e OVX+TCT, submetidos a terapia de choque térmico, que consistiu em banho quente ( $42^{\circ}$  C), com temperatura retal entre 41 e  $41.5^{\circ}$ C, por 15 minutos, 1X/semana, durante 12 semanas. Os resultados obtidos mostram que o ganho de peso ponderal ( $\text{Peso}_{\text{final}} - \text{Peso}_{\text{inicial}}$ ) no grupo OVX ( $29,8 \pm 14,7$  g) foi maior do que nos grupos C ( $15,3 \pm 8,8$  g) e TCT ( $10,4 \pm 7,5$  g), o que não ocorreu no grupo OVX+TCT ( $24,8 \pm 17,5$  g), não obstante o consumo calórico similar. A colesterolemia total foi maior nos grupos OVX e OVX+TCT vs C (OVX= $79 \pm 11,6$  e OVX+TCT= $82,4 \pm 15,1$ ; C= $61,7 \pm 6,7$ ; TCT= $69,3 \pm 9,4$  mg/dL), contudo, a fração HDL foi maior no grupo OVX+TCT vs OVX (OVX+TCT= $28,6 \pm 4,3$ ; OVX= $23,00 \pm 3,8$ ; TCT= $21,9 \pm 1,8$ ; C= $21,00 \pm 2,5$  mg/dL). Observou-se uma maior concentração de triglicerídeos no grupo OVX+TCT ( $110 \pm 18,2$  mg/dL) vs OVX ( $70,63 \pm 23,31$  mg/dL) e vs C ( $74,83 \pm 8,79$  mg/dL). Não houve alteração na glicemia de jejum e na resposta aos testes de tolerância à glicose e à insulina. Os animais ovariectomizados e submetidos a terapia de choque térmico apresentam maior concentração de leucócitos, com perfil de linfocitose em relação aos grupos C e TCT. Quanto a resposta de defesa, observou-se um aumento na concentração de eHSP72 nos animais submetidos a terapia térmica (C vs TCT) porém, esta diferença não é detectada entre os grupos de animais ovariectomizados (OVX vs OVX+TCT). Os efeitos da ovariectomia e da respectiva terapia de choque térmico sobre o estresse oxidativo (EO) e expressão de HSP70 diferem em relação ao tecido analisado. Em relação a iHSP70 observou-se maior expressão no grupo OVX+TCT vs OVX no tecido adiposo, e menor expressão no tecido aórtico (grupo OVX+TCT vs C), não sendo observadas diferenças entre os grupos nos demais tecidos. Em relação ao estresse oxidativo, no tecido aórtico não se observa alteração na lipoperoxidação apesar da menor atividade da enzima CAT nos grupos ovariectomizados comparado ao grupo C. No tecido hepático, a ovariectomia e a terapia de choque térmico causam maior lipoperoxidação (OVX e TCT vs C), porém a combinação OVX + TCT aumenta a atividade da enzima SOD (OVX + TCT vs C). A concentração das enzimas ALT e AST revela atividade hepática normal em todas as condições experimentais. No tecido muscular (gastrocnêmio) observa-se redução do dano oxidativo no grupo OVX+TCT vs os demais grupos, e aumento da atividade da SOD no grupo OVX+TCT vs TCT. No tecido adiposo, há menor atividade da enzima catalase (OVX e OVX+TCT vs C), predispondo-o a peroxidação lipídica (OVX+TCT vs C). O índice

H foi analisado para cada tecido individualmente e seus valores não diferem em razão da ovariectomia e/ou da terapia de choque térmico, nas diferentes condições experimentais. Apesar das evidências acerca dos benefícios da terapia térmica em animais ovariectomizados, outros estudos são necessários para elucidação dos mecanismos envolvidos no efeito da terapia de choque térmico sobre o metabolismo, especialmente de triglicerídeos, e respectivas implicações na homeostase vascular e metabólica.

**Palavras-chave:** Ovariectomia; HSP70; estresse oxidativo; triglicerídeos; colesterolemia; terapia de choque térmico.

## ABSTRACT

The female body, in the absence of estrogen, is subject to metabolic stress, which increases the risk of developing chronic diseases. In addition, the cellular response to stress, cytoprotective and antiinflammatory action, mediated by the heat shock protein expression of 70 kDa (HSP70), may be impaired in the absence of estrogen. This study evaluated the effect of heat shock therapy on biometric, hematological and biochemical parameters, redox state and intra and extracellular concentration of HSP70 in ovariectomized adult Wistar rats. They used 32 Wistar rats with 5 months (+ 200g), from the animal facility of UNIJUI (CEUA / UNIJUI, Opinion No. 003/2015). The animals were divided into 4 groups: C (control) and TCT (Thermal shock therapy), both were sham-operated; OVX (ovariectomy) and OVX + TCT (ovariectomy + heat shock therapy), submitted to ovariectomy. C and OVX groups were kept normothermic and TCT and OVX + TCT groups submitted to heat shock treatment, which consisted of hot bath (42 ° C) with rectal temperatures between 41 - 41.5 ° C for 15 minutes, 1X / week for 12 weeks. The results show that the weight gain (Final weight - Initial weight) in OVX group (29.8 ± 14.7 g) was higher than in group C (15.3 ± 8.8 g) and TCT ( 10.4 ± 7.5 g), which did not occur in the OVX + TCT group (24.8 ± 17.5 g), despite similar caloric consumption. The total blood cholesterol was higher in OVX and OVX groups + TCT vs C (OVX = 79 ± 11.6 and OVX + TCT = 82.4 ± 15.1; C = 61.7 ± 6.7; TCT = 69.3 ± 9.4 mg / dl), however, the HDL fraction was higher in OVX + TCT vs OVX group (OVX + TCT = 28.6 ± 4.3; OVX = 23.00 ± 3.8, TCT = 21.9 ± 1.8; C = 21.00 ± 2.5 mg / dL). There was a higher concentration of triglycerides in the OVX group TCT + (110 ± 18.2 mg / dL) vs. OVX (70.63 ± 23.31 mg / dL) vs and C (74.83 ± 8.79 mg / dL). There was no change in fasting glycemia and in response to glucose tolerance and insulin tests. Ovariectomized animals and subjected to thermal shock therapy have higher concentrations of leukocytes with lymphocytosis profile with respect to C and TCT groups. The defense response, there was an increase in the concentration of eHSP72 in animals subjected to thermal therapy (C vs TCT) but this difference is not found between the ovariectomized groups of animals (OVX vs OVX + TCT). The effects of ovariectomy and their thermal shock therapy for oxidative stress (OS) and HSP70 expression differ in the examined tissue. Regarding iHSP70 showed higher expression in OVX group + TCT vs OVX in adipose tissue, and lower expression in aortic tissue (OVX + TCT vs C group), differences were observed between groups in other tissues. In relation to the oxidative stress in aortic tissue was not observed change in lipid peroxidation despite the lower activity of CAT enzyme in ovariectomized animals groups compared to group C. In liver tissue, ovariectomy and thermal shock therapy cause lipoperoxidation higher (vs OVX and TCT C), but the combination OVX + TCT increases the activity of SOD (OVX + TCT vs C). The concentration of enzymes ALT and AST activity in normal liver reveals all experimental conditions. In muscle tissue (gastrocnemius) observed reduction of oxidative damage in OVX + TCT group vs the other groups, and increased SOD activity in OVX group vs + TCT TCT. In adipose tissue, there is lower activity of catalase (OVX and OVX + TCT vs C), predisposing the lipid peroxidation (OVX + TCT vs C). The H index was analyzed and their values do not differ because of ovariectomy and / or heat shock therapy, the different experimental conditions. Despite evidence of the benefits of the thermal therapy in ovariectomized animals, further studies are required to elucidate the mechanisms involved in the effect of heat shock therapy on metabolism, especially triglycerides and their implications in metabolism and in the vascular homeostasis.

**Keywords:** Ovariectomy; HSP70; oxidative stress; triglycerides; cholesterolemia; heat shock therapy.

The female body, in the absence of estrogen, is subject to metabolic stress, which increases the risk of developing chronic diseases. In addition, the cellular response to stress, cytoprotective and antiinflammatory action, mediated by the heat shock protein expression of 70 kDa (HSP70), may be impaired in the absence of estrogen. This study evaluated the effect of heat shock therapy on biometric, hematological and biochemical parameters, redox state and intra and extracellular concentration of HSP70 in ovariectomized adult Wistar rats. They used 32 Wistar rats with 5 months (+ 200g), from the animal facility of UNIJUI (CEUA / UNIJUI, Opinion No. 003/2015). The animals were divided into 4 groups: C (control) and TCT (Thermal shock therapy), both were sham-operated; OVX (ovariectomy) and OVX + TCT (ovariectomy + heat shock therapy), submitted to ovariectomy. C and OVX groups were kept normothermic and TCT and OVX + TCT groups submitted to heat shock treatment, which consisted of hot bath (42 ° C) with rectal temperatures between 41 - 41.5 ° C for 15 minutes, 1X / week for 12 weeks. The results show that the weight gain (Final weight - Initial weight) in OVX group (29.8 ± 14.7 g) was higher than in group C (15.3 ± 8.8 g) and TCT ( 10.4 ± 7.5 g), which did not occur in the OVX + TCT group (24.8 ± 17.5 g), despite similar caloric consumption. The total blood cholesterol was higher in OVX and OVX groups + TCT vs C (OVX = 79 ± 11.6 and OVX + TCT = 82.4 ± 15.1; C = 61.7 ± 6.7; TCT = 69.3 ± 9.4 mg / dl), however, the HDL fraction was higher in OVX + TCT vs OVX group (OVX + TCT = 28.6 ± 4.3; OVX = 23.00 ± 3.8, TCT = 21.9 ± 1.8; C = 21.00 ± 2.5 mg / dL). There was a higher concentration of triglycerides in the OVX group TCT + (110 ± 18.2 mg / dL) vs. OVX (70.63 + 23.31 mg / dL) vs and C (74.83 ± 8.79 mg / dL). There was no change in fasting glycemia and in response to glucose tolerance and insulin tests. Ovariectomized animals and subjected to thermal shock therapy have higher concentrations of leukocytes with lymphocytosis profile with respect to C and TCT groups. The defense response, there was an increase in the concentration of eHSP72 in animals subjected to thermal therapy (C vs TCT) but this difference is not found between the ovariectomized groups of animals (OVX vs OVX + TCT). The effects of ovariectomy and their thermal shock therapy for oxidative stress (OS) and HSP70 expression differ in the examined tissue. Regarding iHSP70 showed higher expression in OVX group + TCT vs OVX in adipose tissue, and lower expression in aortic tissue (OVX + TCT vs C group), differences were observed between groups in other tissues. In relation to the oxidative stress in aortic tissue was not observed change in lipid peroxidation despite the lower activity of CAT enzyme in ovariectomized animals groups compared to group C. In liver tissue, ovariectomy and thermal shock therapy cause lipoperoxidation higher (vs OVX and TCT C), but the combination OVX + TCT increases the activity of SOD (OVX + TCT vs C). The concentration of enzymes ALT and AST activity in normal liver reveals all experimental conditions. In muscle tissue (gastrocnemius) observed reduction of oxidative damage in OVX + TCT group vs the other groups, and increased SOD activity in OVX group vs + TCT TCT. In adipose tissue, there is lower activity of catalase (OVX and OVX + TCT vs C), predisposing the lipid peroxidation (OVX + TCT vs C). The H index was analyzed and their values do not differ because of ovariectomy and / or heat shock therapy, the different experimental conditions. Despite evidence of the benefits of the thermal therapy in ovariectomized animals, further studies are required to elucidate the mechanisms involved in the effect of heat shock therapy on metabolism, especially triglycerides and their implications in metabolism and in the vascular homeostasis.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AKT – Quinase treonina/serina

AMPK – Proteína quinase ativada por AMP

ASC- Área sob a curva

CAT - Catalase

COX – Ciclo-oxigenase

DM2 – Diabetes melitus tipo 2

DNA - Ácido desoxirribonucleico

E1 - Estrona

E2 - Estradiol

E3 - Estriol

EDTA - Ácido etilenodiaminotetra-acético

eHSP70 – HSP70 extracelular

ELISA - Ensaio de imunoadsorção enzimática

ER $\alpha$  = Receptor de estrogênio  $\alpha$

ER $\beta$  = Receptor de estrogênio  $\beta$

ERN- Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FSH – Hormônio folículo estimulante

GLUT4 - Transportador de Glicose 4

GTT – Teste de tolerância à glicose

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HSE - Elemento de resposta ao choque térmico

HSF - Fator de choque térmico

HSP - Proteína de choque térmico

HSR – Resposta ao choque térmico

HTT – *Hot tub therapy*

iHSP70 - HSP70 intracelular

IKK $\beta$  - Quinase do inibidor do fator kappa- $\beta$

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IP – Intraperitoneal

IPGTT– Teste intraperitoneal de tolerância à glicose

ITT – Teste de tolerância à insulina

JNK – Quinase c-Jun N-terminal

KDa = Kilodalton

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LH – Hormônio luteinizante

LPO - Lipoperoxidação

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

NF- $\kappa$ B = Fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B

NO – Óxido nítrico

OVX - Ovariectomia

PBS- Tampão salina tamponada com fosfato

PMSF - Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila

SOD - Superóxido dismutase

TBARS - Teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCT – Terapia de Choque térmico

TLR - *Toll Like Receptors*

TNF $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

TRH – Terapia de Reposição Hormonal

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1	Estrogênio: efeitos gerais e implicações da sua baixa disponibilidade sobre o metabolismo e resposta inflamatória .....	18
2.2	A baixa disponibilidade de estrogênio e a resposta ao choque térmico: concentração intra e extracelular de HSP70 .....	24
2.3	A terapia de choque térmico, a expressão de HSP70 e os respectivos efeitos sobre os perfis metabólico e inflamatório .....	28
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo Geral .....	31
3.2	Objetivos Específicos .....	31
4	METODOLOGIA .....	32
4.1	Animais .....	32
4.2	Grupos experimentais .....	32
4.3	Delineamento experimental.....	33
4.4	Procedimento cirúrgico.....	33
4.5	Determinação do consumo de água, de ração e do perfil biométrico.....	34
4.6	Terapia de choque térmico.....	34
4.7	Teste de Tolerância a Glicose.....	35
4.8	Teste de Tolerância a Insulina .....	36
4.9	Morte dos animais e coleta de material biológico.....	36
4.10	Preparação dos Tecidos .....	38
4.10.1	Homogeneização dos tecidos para Eletroforese .....	38

4.10.2	Homogeneização dos tecidos para Estresse Oxidativo.....	38
4.11	Análises de estresse oxidativo e moleculares.....	39
4.11.1	Dosagem de Proteínas.....	39
4.11.2	Teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico - TBARS....	39
4.11.3	Determinação do conteúdo das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) .....	39
4.11.4	Expressão de HSP70 intracelular (iHSP70) .....	40
4.12	Análises Bioquímicas e Hormonais.....	41
4.12.1	Dosagem de HSP72 extracelular (eHSP72).....	41
4.12.2	Dosagem de Transaminases, Triglicerídeos, Colesterol Total e Lipoproteínas (HDL e VLDL) .....	42
4.12.3	Hemograma.....	42
4.12.4	Dosagem de 17 $\beta$ estradiol.....	43
4.13	Cálculos e Equações.....	43
4.13.1	Índice H – Índice da razão da eHSP70 / iHSP70 .....	43
4.13.2	LDL.....	44
4.13.3	Consumo calórico.....	44
4.13.4	Área sob a curva .....	44
4.14	Análise estatística .....	44
5	RESULTADOS .....	45
5.1	Consumo de ração e perfil biométrico.....	45
5.2	Perfil bioquímico e metabólico.....	48
5.3	Perfil Hematológico e hormonal .....	52
5.4	Expressão de HSP70 .....	55

5.5	Parâmetros de estresse oxidativo e expressão de HSP70 nos tecidos aórtico, hepático, muscular (gastrocnêmio) e adiposo. ....	56
5.5.1	Tecido aórtico .....	57
5.5.2	Tecido hepático .....	59
5.5.3	Tecido muscular .....	62
5.5.4	Tecido adiposo .....	64
5.6	Índice H – razão eHSP70 / iHSP70.....	66
6	DISCUSSÃO .....	67
7	CONCLUSÃO .....	78
8	Considerações finais, limitações do estudo e perspectivas futuras. ....	80
9	REFERÊNCIAS .....	81
10	ANEXOS.....	92
10.1	ANEXO A – Parecer CEUA.....	92
10.2	ANEXO B – Normas da revista .....	94
10.3	ANEXO C – Artigo a ser submetido .....	100

## 1 INTRODUÇÃO

O estrogênio é um hormônio sexual feminino produzido nos ovários. Regula e coordena múltiplas funções em órgãos, células e genes, por meio da interação com receptores  $\alpha$  e  $\beta$ , utilizando vias de sinalização para ativar respostas moleculares e genômicas. Além do seu papel regulador da função sexual e reprodutiva, atua no metabolismo da glicose e de lipídeos, na manutenção do remodelamento ósseo e de funções neurológicas (CAMPOREZ et al., 2013; HSIEH, DEVLIN, MACCORD, 1995; RETTBERG, JIA, BRINTON, 2014).

Há um período da vida das mulheres, situado geralmente entre os 35 e 65 anos, em que ocorrem importantes mudanças hormonais, ao qual denomina-se climatério. Entre os eventos deste período, o mais marcante é a menopausa, cujo quadro clínico caracteriza-se pela cessação permanente da menstruação, conseqüente à perda da função folicular ovariana ou à retirada cirúrgica dos ovários (WHO, 1996; FAVARATO; ALDRHIGUI, 2001).

Estima-se que em 2025, 23% da população dos países desenvolvidos estará com mais de 60 anos (IBGE, 2011) e, conseqüentemente, é previsto o aumento no número de mulheres na pós-menopausa, comparado ao início do século XX, onde apenas cerca de 6% das mulheres atingiam esta condição clínica. Atualmente, na América Latina, as mulheres convivem com o hipoestrogenismo, decorrente da perda da função ovariana, durante praticamente um terço da sua vida, visto que a expectativa de vida da população feminina latino-americana é de 73,6 anos, e a idade da menopausa continua sendo em média 48,7 anos (SOHENACKER et al., 2014).

Os dados epidemiológicos indicam, claramente, a complexidade biológica do impacto da perda hormonal. Um dos resultados da falta de estrogênio é um aumento na mortalidade da população feminina, independentemente da idade da mulher, em decorrência do aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, principalmente de ordem cardiometabólica (NELSON, 2008). A perda da função

folicular ovariana ou a remoção cirúrgica dos ovários predispõem o organismo à importantes alterações metabólicas que resultam em aumento do peso corporal, da glicemia de jejum, da resistência insulínica e em dislipidemia (SHOENACKER et al., 2014).

Estudo feito no Hospital de Clínicas da USP (SANTOS et al., 2011) mostra dados relevantes, onde 68% das mulheres chegam na menopausa com sobrepeso, ou obesidade, 67% tem problemas vasomotores, 44,94% mostram-se hipertensas e 10,01% apresentam Diabetes tipo 2.

Medidas terapêuticas vêm sendo estudadas na perspectiva de diminuir os efeitos da falta de estrogênio na pós-menopausa, dentre elas a terapia de reposição hormonal (LORENZI et al, 2009). Entretanto, apesar dos seus benefícios, sabe-se que a terapia de reposição hormonal pode apresentar riscos, como ocorrência de câncer de mama e trombose (SPANGENBURG; JACKSON, 2013). Neste contexto, faz-se pertinente e importante, investigar outras formas de intervenção, bem como, seus respectivos efeitos sobre mecanismos endógenos de citoproteção contra condições de estresse, a fim de prevenir danos e reduzir o risco de doenças cardiometabólicas.

A falta de estrogênio (ESCALANTE-GÓMEZ, et al. 2009) e as mudanças metabólicas ocorridas em razão do seu declínio, predispõem o organismo feminino ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de espécies reativas de nitrogênio (ERN), resultando em aumento do estresse oxidativo (EO) (BETSY et al., 2009), evidenciando a importância das defesas antioxidantes. Dentre os importantes mecanismos endógenos para a proteção do organismo contra diferentes condições de estresse, destaca-se a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) e as defesas antioxidantes. Em relação à expressão de HSP70, sabe-se que ela é sensível à ocorrência de EO (AHN; THIELE, 2003) e à disponibilidade de estrogênio, sendo que na falta de estrogênio parecem ocorrer alterações nas concentrações de HSP70 tanto no meio intracelular como no extracelular (HOU et al., 2010; VOSS et al., 2003).

Nesse contexto, está a importância da visão da equipe multidisciplinar em pesquisar novas terapêuticas, como a expressão de HSP70 através da terapia térmica, visando melhorar as condições da saúde e qualidade de vida da mulher no período da pós menopausa ou de privação de estrogênio.

As proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock protein*), dentre as quais encontra-se a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), fazem parte de uma grande família de proteínas que integram um sistema de defesa celular complexo e altamente conservado. Desempenham papel fundamental durante a síntese, montagem, dobramento e degradação de proteínas (função chaperona), atuando na preservação da sobrevivência celular sob condições ambientais adversas. Sua expressão celular (iHSP70) está relacionada também com mecanismos antiapoptóticos e ações anti-inflamatórias (ASEA; DE MAIO, 2007). A terapia de choque térmico é capaz de induzir a expressão de HSP72 em vários tecidos, prevenindo vários efeitos metabólicos a nível molecular (CHUNG et al., 2008; GUPTE et al., 2009).

A hipótese é de que o aumento da expressão de HSP70, induzido por meio da terapia de choque térmico, possa ter influência positiva sobre o metabolismo de tecidos como fígado, adiposo, muscular e aórtico, minimizando os efeitos da falta de estrogênio, considerando que a ovariectomia está associada com alterações na homeostase metabólica. Para tanto o objetivo foi analisar os efeitos da terapia de choque térmico sobre parâmetros biométricos, hematológicos e bioquímicos, e respostas celulares de defesa, marcadas pela concentração de HSP70 e defesas antioxidantes enzimáticas, em modelo experimental de ovariectomia.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Estrogênio: efeitos gerais e implicações da sua baixa disponibilidade sobre o metabolismo e resposta inflamatória**

O estrogênio é um hormônio de natureza esteróide, sintetizado a partir do colesterol, em três formas diferentes: a estrona (E1), o estradiol (E2) e o estriol (E3). É um dos mais importantes hormônios do organismo feminino, com papel regulador da função sexual e da reprodução (RETTBERG; JIA; BRINTON, 2014). Durante a vida reprodutiva da mulher, a principal forma de estrogênio circulante é o 17 $\beta$ -estradiol (E2), produzido principalmente nos ovários, sob regulação do eixo hipotálamo-hipófise. Sua biossíntese se dá em células granulosas dos folículos ovarianos, sob estímulo do hormônio folículo estimulante (FSH), a partir de precursores androgênicos (androstenediona ou testosterona), produzidos nas células tecais dos folículos ovarianos sob estímulo do hormônio luteinizante (LH) (BALTHAZART, BALL, 2006).

Todas as formas de estrogênio são produzidas, além dos ovários, em outros tecidos como nas glândulas suprarrenais, adipócitos, tecido mamário e hepatócitos (SLUIJMER et al., 1998). A estrona, considerada uma forma mais sutil é predominante no período da menopausa. Na pós-menopausa, ela é normalmente produzida a partir da conversão da androstenediona nos tecidos adiposo e hepático (COOKE et al., 2004).

Os principais benefícios fisiológicos gerados pelo estrogênio são os provenientes do E2. Por ser uma molécula de sinalização sistêmica, que regula e coordena múltiplas funções em órgãos, células e genes, o estrogênio é conhecido como hormônio multifuncional. Ele apresenta propriedades vasodilatadoras, antioxidantes e desempenha função reguladora metabólica funcional, em especial nos tecidos adiposo, muscular esquelético e cardiovascular (PELLEGRINI et al., 2014; KIM et al., 2014; MEYER et al., 2014). Exerce também atividade reguladora sobre diversos processos fisiológicos incluindo o metabolismo da glicose e de

lipídeos, e a manutenção do remodelamento ósseo (CAMPOREZ et al., 2013; HSIEH; DEVLIN; MCCORD, 1995).

Décadas de pesquisas compiladas em uma revisão mostram que o estrogênio é também uma molécula de sinalização crítica dentro do cérebro (BRINTON, 2008). Pode prevenir a obesidade atuando em centros hipotalâmicos reguladores da fome e saciedade e estimulando a oxidação lipídica no fígado e músculo, por meio do aumento da expressão de genes envolvidos neste processo (STUBBINS et al., 2012).

Muitos dos efeitos do E2 são considerados citoprotetores, especialmente no sistema cardiovascular, onde ele exerce ação antioxidante, por meio da elevação da lipoproteína de alta densidade (HDL) e diminuição do lipoproteína de baixa densidade (LDL), e também, por regular a produção de biomoléculas como prostaglandinas. As ações dos estrogênios têm sido detectadas em células musculares lisas e endoteliais nas artérias coronárias, e causam vasodilatação por meio do aumento da formação e liberação de óxido nítrico e prostaciclina (LEVIN, 2002). O estrogênio pode inibir a apoptose das células endoteliais e promover a atividade angiogênica *in vitro*, sendo assim considerado vasoprotetor (ZHU; CONNEY, 1998).

O estrogênio apresenta importante atividade antioxidante por apresentar grupamento hidrofênolico em sua molécula, que lhe confere ação como *scavenger* (limpador) de ERO, diminuindo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (LEVIN, 2002; ZHU; CONNEY, 1998). O efeito do estrogênio sobre o EO é dependente da sua concentração e estrutura química. Concentrações elevadas de estrogênio circulante tendem a ter um efeito benéfico, ou seja, efeito antioxidante por meio da inibição da  $\alpha$ -hidroxilação das bases guanina do DNA. Em concentrações baixas, esse hormônio tem um efeito pró-oxidante, especialmente quando a sua estrutura química contém um catecol (DOSHI; AGARWAL, 2013).

O papel do estrogênio também é descrito como modulador de respostas imunes, por meio de efeitos tanto estimuladores (em doses baixas) como supressores (em doses altas). Receptores de estrogênio foram encontrados em

algumas subpopulações de linfócitos onde modulam a função, reduzem a produção de fatores imunorreguladores, limitam a expressão de antígenos e diminuem a capacidade de reação dos linfócitos às outras células (GROSSMAN; ROSSELE; MENDENHALL, 1991).

Considerando a natureza reguladora multifuncional do estrogênio, são muitas as alterações teciduais causadas pelo declínio da produção desses esteróides sexuais, gerado pela perda da função ovariana ou pela remoção cirúrgica dos ovários. As implicações da sua falta atingem tecidos não reprodutivos e causam sintomas vasomotores (fogachos e suores noturnos), declínio cognitivo, assim como aumento no risco de doenças crônico-degenerativas, como a aterosclerose, doença cardiovascular, osteoporose, doença de Alzheimer, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo II (HENDERSON, 2010; LIU et al., 2001; HUNTER, 1990).

A perda da função ovariana e a conseqüente redução na biodisponibilidade do estradiol estão associadas ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e da respectiva resposta celular (KELLE; ZHANG; YAO, 2001). Da mesma forma, estudos mostram que baixos níveis de estrogênio, observados em animais castrados ou em mulheres após a menopausa, causam atenuação da resposta imune predispondo o organismo à invasão microbiana e possíveis infecções (MEDEIROS; OLIVEIRA, YAMAMOTO, 2003; OLSN; KOWACKS, 1996).

Em relação às alterações metabólicas geradas pela falta de estrogênio, estudos realizados com mulheres em menopausa e em animais ovariectomizados, mostram que a perda da função ovariana resulta em aumento significativo da massa gorda na região abdominal e aumento do peso corporal (SIBONGA et al., 2003). A deposição de gordura, especialmente visceral, gera uma doença inflamatória crônica, em que a resolução fisiológica da inflamação é reduzida, conduzindo a inflamação de baixo grau em todo o corpo (NEWSHOLME; DE BITTENCOURT Jr., 2014).

Investigações realizadas por Heine et al., (2000), utilizando camundongos machos e fêmeas *knockout* para receptores de estrogênio, mostram que esses animais apresentaram aumento do tecido adiposo branco, resistência insulínica e

piora na tolerância a glicose e indicam alterações no dispêndio de energia, como uma diminuição do gasto energético nas fêmeas *knockout* para o receptor de estrogênio (HEINE et al, 2000).

O estudo de Camporez e colaboradores (2013) com camundongos fêmeas ovariectomizados, também sugere que as alterações no peso e na massa de tecido adiposo dos animais ovariectomizados possam decorrer de mudanças no dispêndio de energia, ocorridas por ocasião da diminuição progressiva nos níveis de estrogênio, comum na transição da menopausa (CAMPOREZ et al.,2013).

Estudos mostram que animais ovariectomizados apresentam desequilíbrio na função lipolítica do tecido adiposo visceral, com aumento na lipólise basal resultando em um aumento de ácidos graxos livres circulantes e uma fraca capacidade de mobilizá-los em condições de estresse metabólico (SPANGENBURG; JACKSON, 2013).

O aumento da quantidade circulante de ácidos graxos e o armazenamento de gordura ectópica eleva o risco de várias formas de lipotoxicidade nos tecidos periféricos, o que contribui para o desenvolvimento de disfunção celular (SPANGENBURG; JACKSON, 2013). Dados de estudos realizados com ratas ovariectomizadas mostram que o alvo primário do aumento de lipídios circulantes é o músculo esquelético predispondo, assim, ao desenvolvimento de resistência total periférica à insulina (JACKSON et al., 2013).

Ainda sobre o aspecto de distúrbios metabólicos, o trabalho de Bottner e colaboradores (2008) mostrou que a baixa disponibilidade de estrogênio em ratas (induzida pela ovariectomia), por um período de três meses, está associada com aumento do colesterol total, LDL e diminuição de HDL. No entanto, os pesquisadores observaram que a terapia de reposição hormonal (diferentes doses) foi capaz de melhorar os níveis de LDL, mostrando que a disponibilidade do estrogênio tem implicação especial sobre a sua regulação (BOTTFNER; CHRISTOFFEL; WUTTKE, 2008).

Semelhantemente, mulheres na pós-menopausa também apresentam aumento da concentração sérica de colesterol total, de triglicérides e de LDL, além de diminuição da fração HDL (STEVENSON; CROO; GODSLAND, 1993).

As alterações no metabolismo lipídico, aumento do triglicérideo e do colesterol LDL e diminuição do colesterol HDL, combinada com a falência ovariana e com processos inflamatórios geram um perfil aterogênico (GASPARD; GOTTAL; VANDENBRULE, 1995). Essa combinação é a principal causa do aparecimento de eventos cardiovasculares, que são os responsáveis por quase 50% das mortes em mulheres no período de pós-menopausa (KNOWLTON; SUN, 2001).

O estrogênio, tem papel vasoprotetor, exercendo ações antioxidantes, ajudando a manter os bons níveis de LDL e HDL e ativação da eNOS para produção de óxido nítrico, responsável pelo tônus vascular (SUBBIAH et al., 1993). O estrogênio também tem papel regulador sobre outras moléculas vasoativas como as prostaglandinas (SOBRINO et al., 2010) e proteínas de estresse, como HSP's (HAMILTON et al., 2004).

A falta de estrogênio e as mudanças metabólicas ocorridas em razão do seu declínio predisõem o organismo feminino também à um aumento na produção de ERO e ERN, resultando em aumento do estresse oxidativo (BETSY et al., 2009). Durante toda vida o ser humano é confrontado com o estresse oxidativo, que se agrava com o processo de envelhecimento (VOSS; SIEMS, 2006). Sabe-se que a elevação na produção ERO e de ERN resulta em EO, disfunção mitocondrial e ativação de fatores de transcrição associados ao estresse, como NF- $\kappa$ B, que causam aumento na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (NEWSHOLME; DE BITTENCOURT, 2014).

Estudos realizados com camundongos fêmeos ovariectomizados, tratados com dieta hiperlipídica, demonstram que a ovariectomia está associada com a ocorrência de estresse oxidativo e elevada expressão de mRNA de marcadores inflamatórios no tecido adiposo, quando comparado com fêmeas normais (SPANGENBURG; JACKSON, 2013).

A associação da falta de estrogênio com o EO, estudada em modelo animais em ratas com síndrome metabólica (induzida pelo consumo diário de solução de sacarose), indicam que a remoção de estrogênio (por ovariectomia) diminui a atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) em tecido adiposo intra-abdominal e aumenta a lipoperoxidação (LPO) em adipócitos (GUERRA et al., 2014).

O aumento nos níveis de LPO, a carbonilação de proteínas e os danos causados ao ácido desoxirribonucleico (DNA), são os marcadores indicativos da elevada produção e acúmulo de ERO e uma deficiente/insuficiência na ação antioxidante do organismo (BARBOSA et al., 2010).

O EO, além de danificar diretamente o DNA, proteínas e lipídeos, por oxidação, também causa danos celulares indiretamente, por meio da ativação de uma variedade de vias de sinalização intracelulares, sensíveis ao estresse, como do NF-kB (NEWSHOLME; GAUDEL; KRAUSE, 2012).

As proteínas estão entre os principais alvos por serem abundantes nos sistemas biológicos. Os danos causados nas proteínas têm uma influência importante sobre viabilidade celular uma vez que a maioria desses danos não são reparados e pode ter consequências deletérias sobre a estrutura e função das proteínas. As proteínas, uma vez danificadas, podem formar ligações erradas e fornecer uma base para muitas alterações associadas com a senescência, contribuindo para o aparecimento de várias doenças (HOHN, KONING, GRUNE, 2013). Neste contexto, destaca-se a função de citoproteção realizada pelas proteínas de choque térmico, cuja expressão pode ser induzida por diferentes condições de estresse, conforme descrito a seguir no item 2.3 desta revisão.

## **2.2 A baixa disponibilidade de estrogênio e a resposta ao choque térmico: concentração intra e extracelular de HSP70**

As proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock protein*) fazem parte de uma grande família de proteínas conhecidas como chaperonas. Foram descritas pelo cientista Ferruccio Ritossa, em 1962 (RITOSSA, 1962). Em 1974, foram denominadas de *proteínas de choque térmico*. A maneira como as células respondem ao estresse térmico foi, desde então, denominada de *resposta ao choque térmico* (HSR) ou *resposta ao estresse*, sendo as HSP conhecidas também como proteínas do estresse (DE MAIO et al., 2011).

Essas proteínas são formadas por uma sequência genômica altamente conservada entre espécies, tendo muita importância no processo evolutivo, com origem há 2 milhões de anos (SANTORO, 2000). Sua classificação se dá com base no respectivo peso molecular, estabelecendo as famílias HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 e pequenas proteínas. Em virtude da consequente confusão gerada pela expansão do número de membros conhecidos nas várias famílias de proteínas de choque térmico, e à inconsistência em sua nomenclatura, foi proposto um conjunto de diretrizes para a nomenclatura destas famílias, de acordo com o gene específico, com a seguinte denominação: HSPH (HSP110), HSPC (HSP90), HSPA (HSP70), DNAJ (HSP40) e HSPB (pequenas HSP); famílias das chaperoninas, HSPD/E (HSP60/HSP10) e CCT (TriC) (HAGEMAN et al., 2011).

A HSP70, dentre todas, é a proteína de choque térmico mais conservada filogeneticamente e tem importante expressão celular. É codificada por multigenes e encontrada em distintos compartimentos celulares, como também, no ambiente extracelular (POCKLEY et al., 1998; SANTORO, 2000). A expressão celular de HSP70 ocorre em uma grande variedade de tipos celulares, em condições basais e em condições estimuladas por desafios ou estresse celular (KAMPINGA et al., 2009).

Além da hipertermia, condições tóxicas que levam ao acúmulo de proteínas não ativas, exposição a metais pesados, fármacos citotóxicos, privação de glicose, infecções virais, inflamação e EO, são fatores capazes de induzir a expressão de

HSP70 (GRUNWALD, 2014; SANTORO, 2000; KIANG; TSOKOS, 1998). Assim, essas proteínas podem estar presentes em condições normais e, em maior expressão, em condições de desequilíbrio homeostático, como no estresse térmico, metabólico e oxidativo (KRAUSE et al., 2007; BECKMANN et al., 1992).

O estrogênio também tem papel neuromodulador e neuroprotetor, geralmente dependente da sua ligação com seus receptores nucleares, Manthey e Behl (2006), fizeram análise de DNA para demonstrar um padrão de expressão de genes regulados pelos receptores de estrogênio nas células neuronais em humanos, mostrando que o estrogênio pode regular a expressão de HSP70, em células neuronais (MANTHEY; BEHL, 2006) e, indiretamente, através da ativação da heat shock factor (HSF) por tratamento com dexametasona, aumentando a expressão de HSP72 em até 62% em miócitos cardíacos de ratos fêmeas e machos adultos, conferindo citoproteção contra hipóxia (SUN et al., 2000).

Hamilton e colaboradores (2004), evidenciaram em seu estudo com cultura de células, que o tratamento com tamoxifeno e 17 $\beta$ -estradiol, em estágios agudos e crônicos, que ambos aumentaram a expressão de HSP72 em condição de hipoxia, conferindo citoproteção nessa situação (HAMILTON; GUPTA; KNOWOLTON, 2004).

Considera-se que a indução da expressão de HSP70, com consequente elevação do seu conteúdo intracelular, representa um fator de citoproteção e, por extensão, proteção ao organismo. As HSP70 integram um mecanismo de defesa celular complexo e altamente conservado, e desempenham papel fundamental durante a síntese, montagem, dobramento e degradação de proteínas, atuando assim na preservação da sobrevivência celular sob condições ambientais adversas. Estas funções conferem a estas proteínas a característica de proteínas *chaperonas* (significa 'acompanhante') (FIEGE et al, 1996). A HSP70 e suas co-chaperonas desempenham papel crucial na depuração de proteínas danificadas e podem regular negativamente a apoptose, por ligação e inibição da cascata apoptótica (TAKAYAMA et al., 2003).

A presença/expressão intracelular de HSP70 (iHSP70) está associada também a ações anti-inflamatórias (ATALAY et al., 2009; HECK; SCHOLLER;

BITTENCOURT, 2011), que residem, especialmente, no seu efeito inibitório sobre a ativação e translocação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (ASEA; DE MAIO, 2007). Esta ação tem implicação no sistema imunológico, em processos inflamatórios e em fatores reguladores da sobrevivência celular e da apoptose (RAN et al., 2004).

O papel citoprotetor da HSP70 tem sido extensivamente documentado em uma variedade de doenças humanas como distúrbios metabólicos, isquemia, inflamação e infecções. Sua falta pode, portanto, estar associada com uma menor capacidade de defesa e maior susceptibilidade a agravos e doenças. Estudos mostram que a produção de HSP70 é reduzida nas condições de falta de estrogênio e/ou envelhecimento. Hou et al., (2010) em seu estudo, com camundongos fêmeas jovens e velhas, submetidas a ovariectomia e estresse térmico, mostraram que a expressão de HSP70 em ratas velhas ovariectomizadas foi significativamente reduzida no cérebro, em comparação com ratas jovens normais e que, a terapia com reposição hormonal com estradiol durante 14 dias restaurou a expressão da proteína. Outros estudos mostram que ratos fêmeas normais apresentam maior concentração de HSP72 no músculo cardíaco quando comparado a ratos machos, e de que esta diferença é perdida quando a disponibilidade de estrogênio é reduzida (por remoção cirúrgica dos ovários) (VOSS et al., 2003).

Por outro lado, estudos realizados por Miragem et al., (2015), com ratas adultas (5 meses) ovariectomizadas, mostram que, no período imediatamente posterior (uma semana) à remoção cirúrgica dos ovários, a baixa disponibilidade de estrogênio circulante não modificou a capacidade de resposta ao tratamento térmico/resposta ao estresse, analisado com base na expressão de HSP70 no tecido aórtico. Os pesquisadores observaram que, apesar da ovariectomia e baixa disponibilidade de estrogênio circulante, houve aumento na expressão de HSP70 induzida por estresse térmico. Tais resultados sugerem que a falta de estrogênio *per si* pode não ser a única razão para a redução da expressão de HSP70 observada no período pós-menopausa de longo prazo (MIRAGEM et al., 2015).

A HSP70 também é encontrada na circulação. O primeiro registro de que a HSP70 havia sido detectada na circulação sanguínea data do final dos anos 80

(HIGHTOWER; GUIDON, 1989; POCKLEY et al. 1998). Os mecanismos envolvidos na liberação de proteínas de choque térmico na circulação podem ser classificados em passivos (necrose, trauma ou infecção) e ativos (inflamação, exercício e estresse psicológico). Estudos mostram que vários tipos celulares a secretam, como as células neuronais, os monócitos, macrófagos e linfócitos B, as células tumorais e o tecido adiposo marrom (CALDERWOOD et al., 2007). Trabalhos realizados pelo nosso grupo mostram que animais submetidos a choque térmico e sobrecarga de glicose apresentam aumento da concentração de HSP70 na circulação (eHSP70), indicando a liberação desta proteína para a circulação na condição de estresse térmico e metabólico (LUDWIG, 2013).

A origem celular e a função fisiológica da HSP70 extracelular (eHSP70) ainda não estão totalmente esclarecidas. Contudo, sabe-se que os efeitos da eHSP70 envolvem especialmente ações imunorregulatórias, pró-inflamatórias e sinalizadoras de dano ou risco de dano celular (WILLIAMS et al., 2007). A eHSP70 pode iniciar cascatas de sinalização em muitos tipos de células mediadas por receptores da superfície da membrana. Dentre eles, incluem-se os *Toll Like Receptors* (TLR) e membros de família de receptores *scavenger* (CALDERWOOD et al., 2007). A eHSP70 pode ligar-se a receptores tipo TLR-2 e TLR-4, localizados na superfície de células apresentadoras de antígenos, induzindo à produção de citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico (NO) (ASEA, 2008).

O equilíbrio entre as concentrações de HSP70 extracelular e intracelular, ou seja, a razão  $[eHSP70] / [iHSP70]$  (Índice H) conforme proposto por Heck (2011), tem sido considerado um parâmetro importante para análise do estado inflamatório e redox do organismo. Alterações neste parâmetro, com aumento da concentração de eHSP70, podem indicar uma condição desfavorável, com propensão a um estado pró-inflamatório, pró-oxidativo e de resistência insulínica, tendo em vista o fato de que iHSP70 tem sido descrita como citoprotetora e associada com aumento à sensibilidade a insulina. Desta maneira, estimar essa relação pode servir como medidor de predição da resposta inflamatória (KRAUSE et al., 2015a), conforme é proposto em nosso estudo.

### **2.3 A terapia de choque térmico, a expressão de HSP70 e os respectivos efeitos sobre os perfis metabólico e inflamatório**

A elevação da temperatura corporal acima de valores normais (hipertermia) desencadeia o fenômeno conhecido como resposta ao choque térmico (HSR, do inglês *heat shock response*) ou resposta ao estresse, que, por meio da ativação do fator de transcrição de choque térmico-1 (HSF-1), promove o aumento da expressão celular de HSP72 (SINGH; HASDAY, 2013; ANCKAR; SISTONEN, 2011). O aumento de expressão desta proteína é responsável pela defesa da homeostase proteica contra o estresse proteotóxico, conferindo assim citoproteção, independente do causador do estresse celular inicial (ANCKAR; SISTONEN, 2011).

Por meio da expressão de HSP70, a HSR se constitui também em uma resposta anti-inflamatória, pois a expressão de HSP70 impede a translocação do fator de transcrição inflamatória NF $\kappa$ B ao núcleo (CHEN et al., 2005). Deste modo, a HSR desempenha um papel muito importante para promover a resolução da inflamação, em especial a doença inflamatória crônica comum da obesidade. No entanto, a HSR, que é componente chave da resposta fisiológica para resolver a inflamação, está seriamente comprometida em tecido adiposo e outros órgãos metabólicos (por exemplo, músculo esquelético, fígado e células  $\beta$  pancreáticas) em condições de doença metabólica (NEWSHOLME; DE BITTENCOURT Jr., 2014).

Células que sintetizam HSP70 em resposta à exposição ao estresse, encontram-se mais protegidas contra novas exposições, com aumento na tolerância ao estresse (MEYER, 1999) e prevenção de danos celulares (KALMAR; GREENSMITH, 2009). Estudos demonstram que o aumento na expressão de HSP70 e o pré-condicionamento ao estresse térmico melhoram a sobrevivência de camundongos após insolação por diminuir a isquemia e o dano cerebral (LEE; MCARDLE; GRIFFITHS, 2007). Yang e colaboradores (1998), usando modelo experimental de insolação com ratos, observaram que choque térmico agudo prévio (16 – 48 horas) confere proteção significativa contra possíveis lesões neuronais por insolação, com aumento na expressão de HSP70 cerebral por até 48 horas após a sessão.

Vários estudos já examinaram a hipertermia como método de indução não farmacêutica da expressão de HSP70. Uma observação impressionante destes estudos é de que um breve choque de calor (15 minutos), uma vez por semana, é capaz de produzir melhoras notáveis no estado metabólico. Uma variedade de técnicas tem sido utilizada para indução de hipertermia, como a imersão em água quente, cobertor elétrico quente, sauna, e caixa de infravermelho (HOOPER et al., 2014; KRAUSE et al., 2015b).

A investigação acerca do efeito da terapia térmica (*hot tub therapy* – HTT) em pacientes diabéticos mostra que esta terapia é capaz de produzir melhora de importantes eventos metabólicos relacionados ao diabetes mellitus tipo 2 (DM2) como a redução na ocorrência de complicações, redução da dose de insulina utilizada, da glicemia em jejum, da concentração de hemoglobina glicada e, ainda, do peso corporal (HOOPER, 1999; CHUNG et al., 2008).

Estudos com modelos experimentais de obesidade e resistência insulínica (GUPTE et al, 2008; CHUNG et al, 2008), confirmam os efeitos protetores da terapia térmica sobre o desenvolvimento de complicações do DM2 e indicam que esta proteção parece estar fortemente associada ao efeito da HSP70 sobre a sinalização insulínica. Além disso, demonstram efeitos positivos desta terapia também para a melhora do perfil lipídico e da capacidade antioxidante (BATHAIE et al., 2010).

A terapia térmica, como sauna e banho quente de imersão (ofurô), vem se tornando uma prática terapêutica. Diversos estudos têm mostrado benefícios desta terapia sobre doenças cardiometabólicas. Os mecanismos envolvidos nos benefícios induzidos pela terapia estão relacionados ao aumento da temperatura corporal e elevação crônica de NO, iniciando um ciclo que pode induzir a expressão de HSP70. Como a terapia de choque térmico mantém elevada a concentração de HSP70, pode ocorrer a fosforilação de proteínas celulares como AKT, AMPK e eNOS que, juntos, aumentam (normalizam) os NO, HSP70, AMPK e eNOS, com efeitos positivos sobre a composição corporal, disfunção endotelial, sinalização insulínica e inflamação crônica de baixo grau (comum em pessoas com doença cardiovascular e diabetes) (KRAUSE et al., 2015).

A perda da produção e ação estrogênica, natural ou induzida, pré dispõe o organismo a uma condição de estresse metabólico, com implicações no metabolismo da glicose e das gorduras, resultando em aumento da resistência insulínica, do peso corporal e dislipidemia. Sabe-se que o estrogênio tem ação antioxidante potente, bem como ações anti-apoptóticas e anti-inflamatória (NAHAS et al., 2014) além de estar envolvido positivamente na expressão de HSP70 (HAMILTON et al., 2004). Assim, a alteração na concentração de estrogênio circulante, por ocasião da menopausa ou da ovariectomia, pode estar fortemente associada a diminuição da expressão de HSP70 e, conseqüentemente ao desenvolvimento de doenças crônicas, especialmente cardiometabólicas. Neste contexto, neste trabalho foi investigado o efeito da terapia de choque térmico, indutora da expressão de HSP70, em organismos com reduzida concentração de estradiol, tendo como parâmetros de análises diferentes variáveis metabólicas, biométricas, hematológicas e a resposta de defesa tecidual.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a resposta do efeito da terapia de choque térmico sobre parâmetros biométricos, hematológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo, bem como, sobre a concentração plasmática e expressão celular de HSP70, em ratas Wistar adultas ovariectomizadas no plasma e em diferentes tecidos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Analisar o efeito da terapia de choque térmico, em ratas adultas ovariectomizadas, sobre:

- a) O consumo de ração, a massa corporal e o índice de massa corporal;
- b) A resposta glicêmica, em condições de sobrecarga de glicose e de insulina;
- c) A colesterolemia, a trigliceridemia e a atividade de enzimas hepáticas;
- d) O sistema de defesa leucocitário e o eritrograma;
- e) A concentração plasmática de HSP70;
- f) O dano oxidativo e a atividade de enzimas antioxidantes em tecidos metabólicos e na aorta;
- g) A concentração de HSP70 em tecidos metabólicos e aorta, e o respectivo índice H.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Animais

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais (HOFF, 1980), e do Código Brasileiro de Experimentação Animal – 1988, em conformidade com o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* (NIH).

Submetido à Comissão de Ética para Uso de Animais – CEUA, da UNIJUI, para análise e apreciação sendo aprovado conforme Parecer 003/2015 (ANEXO A).

Foram utilizadas 32 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), virgens, adultas, com 20 semanas de idade, provenientes do biotério da UNIJUI. Os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro 12h/12h, temperatura ambiente de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa do ar a 60%. Os animais foram alimentados com dieta comercial (NUVILAB<sup>®</sup>) e consumiram água *ad libitum*.

### 4.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

**C** – Controle: animais submetidos à falsa cirurgia e mantidos em normotermia (n=9);

**TCT** – Terapia de choque térmico: animais submetidos à falsa cirurgia e à terapia de choque térmico (n=9);

**OVX**– Ovariectomizadas: animais submetidos à intervenção cirúrgica com remoção bilateral dos ovários e mantidos em normotermia (n=7);

**OVX + TCT**– Ovariectomizadas + Terapia de choque térmico: animais submetidos à intervenção cirúrgica com remoção bilateral dos ovários e à terapia de choque térmico (n=7).

### 4.3 Delineamento experimental

Inicialmente, antes da intervenção cirúrgica, os animais foram analisados biometricamente (massa corporal total) e submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT, do inglês *Glucose Tolerance Test*) e teste de tolerância a insulina (ITT, do inglês *Insulin Tolerance Test*). Após foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: ovariectomizados, com remoção de ambos ovários, e controle, submetidos a falsa cirurgia. Após 7 dias os dois grupos de animais foram redistribuídos em 4 grupos: C, TCT, OVX e OVX+TCT. Os animais dos grupos TCT e OVX+TCT foram submetidos, então, a primeira sessão de choque térmico, a qual foi repetida semanalmente (1 x/semana) pelo período de 12 semanas, enquanto os animais dos grupos C e OVX permaneciam em normotermia.

### 4.4 Procedimento cirúrgico

Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram submetidos à anestesia utilizando o seguinte protocolo farmacológico:

- Medicação pré-anestésica: morfina 5 mg/kg IP;
- Indução: isoflurano a 4% inalatório;
- Manutenção: isoflurano a 2% inalatório;
- Pós-operatório: morfina 5 mg/kg subcutânea a cada 4h por 24 horas.

A ovariectomia (OVX) em roedores envolveu a remoção bilateral dos ovários acessados por incisão longitudinal da pele e da musculatura na região caudal à última costela e próxima ao nível do rim. Os animais não ovariectomizados foram submetidos à falsa operação, onde tiveram seus ovários identificados e expostos

cirurgicamente, sendo a seguir reposicionados para posterior sutura da musculatura e pele previamente incisadas.

O procedimento cirúrgico apresentou GRAU DE SEVERIDADE considerado MODERADO, pois se trata de cirurgia sob anestesia geral e analgesia apropriada (sulfato de morfina, 5 mg/kg no trans e pós-cirúrgico por 24h), uma vez que não acarretou prejuízos no bem-estar ou nas condições gerais dos animais, apenas um leve incômodo nos primeiros dias pós-operação. Após os procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram submetidos a tratamento pós-operatório apropriado composto de monitoramento da temperatura corporal e de sinais de dor.

O procedimento cirúrgico foi realizado pela médica veterinária responsável pelo Biotério da UNIJUÍ, em campo estéril, no bloco cirúrgico do Hospital Veterinário desta Universidade.

#### **4.5 Determinação do consumo de água, de ração e do perfil biométrico**

O consumo de água e ração foi acompanhado semanalmente, pela relação entre a oferta e o consumo: [(oferta total/caixa – consumo total/caixa) / número de animais por caixa] (GOETTEMES-FIORIN, 2013). Foi observado que o número de animais na caixa fosse mantido similar entre os grupos, variando de 2-3 animais/caixa. Dados do consumo de ração expresso em gramas e do consumo de água em ml.

Para a determinação do perfil biométrico, os animais foram monitorados semanalmente, sendo pesados antes da analgesia para aferição da massa corporal total, e as medidas das circunferências abdominal e torácica, e do comprimento naso-anal foram aferidas após a sessão de choque térmico com os animais ainda sedados.

#### **4.6 Terapia de choque térmico**

A terapia de choque térmico foi iniciada 7 dias após o procedimento cirúrgico. Todos os grupos foram anestesiados durante o procedimento (xilazina 10 mg.kg<sup>-1</sup>,

0,05 mL de xilazina 2% para 100 g de rato e cetamina 90 mg.kg<sup>-1</sup> i.p. ,0,09 mL de cetamina 10% para 100 g de rato).

Os grupos TCT e OVX+TCT foram submetidos à terapia de choque térmico com **uma sessão semanal**, por um período de **12 semanas**. A anestesia foi utilizada para garantir a supressão do controle da temperatura pelo sistema nervoso central do animal e deste modo, aumentar a temperatura corporal do animal ao valor pré-estabelecido de 41 °C para efetivação do choque térmico e expressão de proteínas de choque térmico (CHUNG et al., 2008; LUDWIG, 2013).

Os animais dos grupos TCT e OVX+TCT foram colocados em um recipiente com água mantida a 42 °C, com a maior parte do corpo submerso (exceto cabeça e membros anteriores). A temperatura corporal foi monitorada com termômetro retal durante todo o período em que o animal estava no banho. Ao atingir a temperatura corporal de 41 °C, era considerado o início da sessão de choque térmico, com duração de 15 minutos, com temperatura retal entre 41 e 41,5 °C (CHUNG et al., 2008; BATHAIE et al., 2010; LUDWIG, 2013).

Os grupos C e OVX também foram anestesiados, porém mantidos em banho com água de 37 °C e temperatura corporal entre 36,5 e 37,5 °C.

Após o período de banho, os animais foram completamente secos, mantidos cobertos com toalhas no laboratório, com temperatura ambiente de 24 °C até recuperação da anestesia. Após completa recuperação da anestesia, foi administrado, em cada animal, solução fisiológica (2,5 mL), por gavagem, para hidratação. Após recuperados da sessão de choque térmico, os animais foram levados de volta ao biotério.

#### **4.7 Teste de Tolerância a Glicose**

Os testes de tolerância à glicose (GTT) foram realizados em todos os grupos experimentais no tempo zero (antes da cirurgia), na 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana de terapia de choque térmico. Os testes foram realizados 48h após a sessão de choque térmico da semana e com os animais em jejum de 12 horas.

Para a realização do teste de tolerância à glicose, foi preparada uma solução de glicose 80% (m/v), administrada na concentração 1g/kg, por via intraperitoneal (IPGTT). Para a obtenção da curva glicêmica, o valor da glicemia em jejum foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório para ambientação, por no mínimo 30 minutos (*tempo zero*), e nos tempos de 30 e 120 minutos após a injeção de glicose. As medidas da glicemia foram feitas com sangue total em punção na veia lateral da cauda dos animais, usando aparelho de leitura glicêmica capilar, glicosímetro *Optium Xceed* da *Abbott*. Dados expressos em mg/dL.

#### **4.8 Teste de Tolerância a Insulina**

Os testes de tolerância à insulina (ITT) foram realizados em todos os grupos experimentais na semana anterior à ovariectomia e após a 10ª semana de terapia de choque térmico. O teste da 10ª semana foi realizado 48h após a última sessão de choque térmico. Os animais foram mantidos alimentados até o momento do início do ITT.

Para a realização do teste de tolerância à insulina foi utilizada a *Insulina Humalog Lispro – Lilly* 100 UI/mL, de ação rápida, diluída em PBS pH 7,4 (NaCl (136,8 mM), KCl (2,7 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,9 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6,4 mM)) 1UI/mL, e aplicada na concentração de 1UI/kg de peso corporal, por via intraperitoneal. Os volumes administrados foram de 1µL para cada g de peso corporal. Para a obtenção da curva glicêmica, o valor da primeira glicemia foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos (*tempo zero*) e nos tempos de 30 e 120 minutos após a injeção de insulina. As medidas da glicemia foram feitas com sangue total em punção na veia lateral da cauda dos animais, usando aparelho de leitura glicêmica capilar, glicosímetro *Optium Xceed* da *Abbott*. Dados expressos em mg/dL.

#### **4.9 Morte dos animais e coleta de material biológico**

Os animais foram eutanasiados 24 horas após o término do último Teste de Tolerância à Glicose (GTT) (após a 12ª sessão de terapia de choque térmico),

portanto, 72 horas após a última sessão de choque térmico. Foi utilizada guilhotina especial para roedores, sendo coletado o sangue troncular para obtenção do plasma, para análises hematológicas, bioquímicas e de estresse oxidativo, e coletados os tecidos adiposo branco abdominal, fígado, músculo gastrocnêmio e aorta, para análises biomoleculares e de estresse oxidativo.

O método escolhido para morte dos animais foi de decapitação, baseado no fato deste ser eficaz, por produzir mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos e no sangue. Considerando-se a necessidade de realização de análises bioquímicas e moleculares teciduais, nenhum anestésico ou outra substância pode ser injetada nos animais por ocasião da decapitação. A morte dos animais sob anestesia, apesar de desejável, é incompatível com nossos experimentos porque todos os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores (BROWN et al., 2005; SAHA et al., 2005). Além disso, esses anestésicos interferem em diferentes funções das células, como às envolvidas na produção de proteínas de choque térmico (CHUNG et al., 2008), cuja expressão é uma das principais variáveis do estudo. O GRAU DE SEVERIDADE para este procedimento é considerado SEM RECUPERAÇÃO. Os animais foram decapitados em ambiente exclusivamente destinado à morte dos animais, com exaustão e higienização completa de todo o material entre a morte de um animal e outro. A decapitação foi efetuada no Laboratório de Ensaios Biológicos.

Após a morte os animais foram dissecados para coleta dos tecidos e, para o descarte, foram colocados em sacos plásticos de resíduos biológicos e congelados em freezer (-20 °C) destinado para este objetivo, no próprio Laboratório de Ensaios Biológicos, até recolhimento pelo serviço terceirizado de coleta de resíduos da UNIJUÍ, realizado pela empresa Stericycle, de Santa Maria-RS.

Os tecidos estudados (tecido adiposo branco abdominal, muscular esquelético gastrocnêmio, hepático e aorta) foram coletados integralmente e pesados imediatamente após a coleta (ao final do período de tratamento, após a morte dos animais), para estabelecimento da relação entre o peso dos tecidos em relação ao peso corporal total, em termos percentuais.

#### **4.10 Preparação dos Tecidos**

O tecido adiposo (abdominal), o fígado, o músculo esquelético (gastrocnêmio) e a aorta integralmente, foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer até a preparação das amostras para as diferentes análises.

O sangue troncular foi coletado, centrifugado à 3000 r.p.m, por 5 minutos, à temperatura ambiente, em centrifuga hematológica. O plasma com EDTA e/ou soro utilizado nas análises bioquímicas foi preparado a partir de amostras de sangue coletadas em tubos individuais, preparados conforme as especificações para análise de glicose, lipídeos, enzimas, níveis de HSP70 e estrogênio.

##### **4.10.1 Homogeneização dos tecidos para Eletroforese**

Fez-se uma solução tampão com inibidores de protease, para cada 1 mL de tampão, adicionou-se 1µl de PMSF. Pesou-se o tecido (adiposo, aorta, fígado e gastrocnêmio) e, para cada 1 grama de tecido, adicionou-se quantidades específicas de tampão SDS 0,1% (conforme cada protocolo). Picotou-se o tecido com tesoura cirúrgica e homogeneizou-se até o tecido estar completamente homogêneo. Após a homogeneização, o tecido adiposo é aliquotado e congelado, os homogenatos dos demais tecidos, aorta, fígado e gastrocnêmio foram centrifugados 10 minutos a 4000 r.p.m., para a coleta do sobrenadante e posterior realização das análises.

##### **4.10.2 Homogeneização dos tecidos para Estresse Oxidativo**

Fez-se uma solução tampão com inibidores de protease, para cada 1 mL de tampão, adicionou-se 1µl de PMSF. Pesou-se o tecido (adiposo, aorta, fígado e gastrocnêmio) e, para cada 1 grama de tecido, adicionou-se quantidades específicas de tampão KPI pH 7,4 ..Picotou-se o tecido com tesoura cirúrgica, e homogeneizou-se até o tecido estar completamente homogêneo, manteve-se no gelo até centrifugação. Os homogenatos de aorta, fígado e gastrocnêmio foram centrifugados 10 minutos a 4000 rpm e coletou-se o sobrenadante. O homogenado do tecido adiposo branco foi centrifugado por 10 minutos à 1000 rpm, coletando-se o infranadante para posterior análise.

Toda a aorta foi homogeneizada a fim de propiciar a quantidade suficiente de material biológico para realização das análises.

#### **4.11 Análises de estresse oxidativo e moleculares**

##### **4.11.1 Dosagem de Proteínas**

A concentração de proteína no plasma e nos tecidos homogeneizados foi determinada pelo método espectrofotométrico de Bradford, a 595nm, utilizando curva padrão de albumina (BRADFORD, 1976).

##### **4.11.2 Teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico - TBARS**

A determinação da lipoperoxidação foi realizada pela técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE; AUST, 1978). Para mensurar o TBARS a proteína dos homogenatos foram precipitadas com ácido tricloroacético à 10%, centrifugados e incubados com ácido tiobarbitúrico (1:1) (Sigma, Chem. Co.) por 15 minutos à 100 °C. O TBARS foi extraído utilizando butanol (1:1). Após centrifugação, a absorbância da camada de butanol foi mensurada por espectrofotometria à 535 nm. A concentração de TBARS foram expressadas em mmol de MDA / mg de proteínas.

##### **4.11.3 Determinação do conteúdo das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)**

A análise da atividade da SOD foi realizada pela técnica de inibição da auto-oxidação do pirogalol (MARKLUND; MARKLUND, 1974). Em uma cubeta, acrescentou-se 970 µl de tampão Tris 50mM/EDTA 1 mM (pH 8.2), 4 µl de catalase e por fim 10 µl de plasma/tecido homogeneizado foram adicionados e misturados. Depois, com a cubeta já dentro do espectrofotômetro, adicionou-se 16µl de pirogalol (24mM em HCl 10mM). A atividade da SOD foi determinada a 420 nm, por 120 segundos. Os resultados foram expressos em U de SOD / mg de proteína.

A atividade da Catalase (CAT) foi realizada de acordo com a descrição de Aebi (1984). Em uma cubeta de quartzo colocou-se 955 µl de tampão fosfato (50mM, pH7.4) e 10 µl de plasma/tecido homogeneizado. Logo após, adicionado 35µl de peróxido de hidrogênio (10,5 mM) a solução misturada e a decomposição do peróxido de hidrogênio via atividade da CAT foi determinado através de leitura em espectrofotômetro à 240nm, por 120 segundos. Os resultados foram expressos em U de CAT / mg de proteína.

#### **4.11.4 Expressão de HSP70 intracelular (iHSP70)**

A expressão de HSP70 no músculo esquelético (gastrocnêmio, fígado, tecido adiposo e aorta) foram realizadas por análises de imunoblotting (LAEMMLI, 1970). Quantidades equivalentes de proteína de cada amostra (~ 20 ug) foram preparadas em Sample Buffer [Tris 50 mM, SDS a 10%, glicerol a 10%, 2-mercaptoetanol a 10% e azul de bromofenol a 2mg/ml]. As amostras foram fervidas durante 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (5h em 15 mA/gel).

Para cada amostra foram realizadas 2 separações por eletroforese, sendo uma para imunodeteção e quantificação da proteína de interesse (HSP70) e outro para quantificação do normalizador, actina. Para imunodeteção de HSP70 (70kDa) as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF por eletrotransferência (1h à 100 V) e, subsequentemente, as bandas transferidas serão visualizadas com 0,3% (w / v) de Red Ponceau S (Sigma-Aldrich). As membranas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem TBS-Tween 0,1% (cada lavagem com duração de 10 minutos, totalizando 30 minutos ao todo), em seguida foram blotadas com 10% (w/v) de leite em pó em TBS-Tween 0,1% por 30 minutos. Após, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147) (1:1000), seguido de três lavagens com TBS-Tween 0,1%, em seguida incubadas com segundo anticorpo contendo peroxidase (Sigma A9044) (1:15000) e lavadas novamente como o procedimento padrão. A visualização das bandas foi realizada utilizando Reagente ECL-Prime Western blot (GE Healthcare). Para a quantificação do normalizador Actina (43 kDa), o segundo gel de cada amostra foi corado com Coomassie Blue e em seguida passaram por processos de

lavagem de Ácido Acético 5% até ótima visualização das bandas. A quantificação das bandas foi realizada utilizando o programa Image J ®. Os dados foram apresentados em unidades arbitrárias de HSP70 normalizados em por actina (43kDa). Após a normalização por actina, os resultados de iHSP70 foram normalizados pela média do grupo controle de cada gel analisado.

## **4.12 Análises Bioquímicas e Hormonais**

### **4.12.1 Dosagem de HSP72 extracelular (eHSP72)**

Para as amostras de plasma a dosagem foi realizada com a utilização de Kit comercial para ELISA *Enzo Life Sciences EKS-715* (450 nm). O sangue total foi coletado em ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) na concentração de 2mg/mL de sangue. Após a coleta, centrifugou-se as amostras a 3000 r.p.m por 15 minutos. Após a centrifugação o plasma foi armazenado com inibidores de proteases PMSF (Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila; Sigma P7626; FW= 174,19 g/mol) [1,74 mg/mL = 100 mM].

Para realização do teste de ELISA, as amostras foram diluídas 1:4 (40µl de amostra + 120 µl de *tampão de ensaio*). Também foi preparada uma curva padrão com 7 pontos. No decorrer da placa de ELISA, o primeiro poço fica vazio, após foram pipetados 100µl de cada ponto da curva em seu respectivo lugar na placa e na sequência, 100 µl de cada amostra em seu respectivo local na placa, ao fim fazendo o selamento da placa, mantida em incubação por 2 horas em oscilador horizontal, em temperatura ambiente.

Após as duas horas a placa foi lavada (de forma automática – lavadora de Elisa Mindray) com 400µl de solução de lavagem (*wash buffer*) para cada amostra, repetindo o processo por 4 vezes. Quando a lavagem terminou, certificou-se através de batidas em um papel toalha, que não há sobras de tampão de lavagem na placa, adiciona-se então, 100µl do primeiro anticorpo em cada poço, exceto no branco, incubando por mais 1 hora, selando a placa e mantendo-a no agitador horizontal. Repete-se a lavagem e adiciona-se 100µl do segundo anticorpo, incubando por mais uma hora. Após conjugado e adicionada a solução stop, fez-se a leitura para

quantificação na leitora de ELISA Mindray, à 450nm, e os resultados expressos em ng HSP70/mL.

#### **4.12.2 Dosagem de Transaminases, Triglicerídeos, Colesterol Total e Lipoproteínas (HDL e VLDL)**

As dosagens das transaminases foram realizadas por metodologia cinética. Os triglicerídeos, colesterol total e lipoproteínas foram realizados por metodologias colorimétricas, com dosagens diretas. Para realização destas análises foram utilizados kits da Bioclin – Quibasa e realizadas através da automação BS200-Mindray, para tal foram utilizados aproximadamente 200µl de soro por animal e 500µl de reagente de cada análise realizada.

#### **4.12.3 Hemograma**

O sangue foi acondicionado em tubo com anticoagulante (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos (5µl de EDTA, para cada 500 µl de sangue). Para a determinação automatizada foi utilizado o analisador hematológico Micros 60 (Horiba), seguindo as recomendações do fabricante. Através desse equipamento foi possível obter os seguintes parâmetros: contagem total de hemácias, hematócrito, hemoglobina, índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), amplitude de distribuição dos eritrócitos - RDW; contagem total de leucócitos, contagem relativa e absoluta de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) além da contagem de plaquetas (Horiba- Manual do usuário).

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.

#### 4.12.4 Dosagem de 17 $\beta$ estradiol

Para dosagem de 17 $\beta$  estradiol (E2), utilizou-se amostra de soro e realizou-se uma dosagem quantitativa através do sistema automático ADVIA Centaur XP (Siemens Helthcare Diagnosis), por metodologia de quimioluminescência, com sensibilidade e limites do ensaio *in vitro* entre 11,8 e 3.000 pg/mL. Essas análises foram realizadas através do Laboratório Álvaro (DASA).

#### 4.13 Cálculos e Equações

##### 4.13.1 Índice H – Índice da razão da eHSP70 / iHSP70

O índice da razão da HSP70 extracelular/intracelular (índice H) foi recentemente descrito como índice geral do estado imunoinflamatório de um indivíduo, com base na relação entre a concentração de HSP70 em monócitos / macrófagos e valores séricos. Esta proposição fundamenta-se no fato de que a uma maior concentração de HSP70 no ambiente extracelular (eHSP70) faz prevalecer sinais inflamatórios, visto que sua natureza pró-inflamatória neste ambiente. Por outro lado, para cada situação em particular, quanto mais células são capazes de responder a estímulos de estresse, elevando o conteúdo intracelular de HSP70 (iHSP70), mais células contribuirão para um estado de anti-inflamação. Portanto, se alguém toma  $R_c = [eHSP70]_c / [iHSP70]_c$  como a razão HSP70 em uma situação de controle, sejam quais forem as técnicas utilizadas para avaliar cada eHSP70 e iHSP70, então índice H pode ser calculado como o quociente de qualquer  $R_j = [eHSP70]_j / [iHSP70]_j$  por  $R_c$ , que será, portanto, considerada como a unidade ( $R_c = 1$ ), normalizando todos os resultados restantes nesta situação de "j". Assim, índice  $H = R_j / R_c$  pode permitir comparações entre qualquer situação estressante "j" e que a situação assumida como controle é um. O índice H pode ser aplicado para estimar o estado imune em muitas situações diferentes. Como argumentado anteriormente [11], assumindo o índice H para os controles (repouso) como a unidade, o exercício produz uma mudança no índice H para até 5, o qual é acompanhado por uma elevação nos marcadores inflamatórios e estimulação da proliferação de células. Valores de índice H superiores a 5 denotam uma resposta pró-inflamatória

exacerbada. Por outro lado, índice H entre 0 e 1 indica um estado predominantemente anti-inflamatório. Assim, mudanças no índice H emergem como um potencial novo biomarcador para a inflamação, e como um indicador muito sensível do estado inflamatório (HECK; SCHOLER; BITTENCOURT JR, 2011; KRAUSE et al., 2015; KRAUSE et al 2015b; GOETTEMMS-FIORIN et al., 2016).

#### **4.13.2 LDL**

Para a determinação do colesterol LDL foi utilizada a fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

$$\text{LDL} = \text{CT} - \text{HDL} - \left( \frac{\text{TRIGLI}}{5} \right)$$

#### **4.13.3 Consumo calórico**

Multiplicou-se a quantidade de gramas de ração consumidas por cada animal, por dia, pela quantidade de calorias da dieta. Seguindo as informações da dieta padrão (16,6MJ/Kg) = 16,6KJ por grama (BOCK et al.,2015).

#### **4.13.4 Área sob a curva**

Para a análise da área incremental sob a curva, a mesma foi calculada geometricamente através da aplicação da regra trapezoidal (USA FAO, 1997).

#### **4.14 Análise estatística**

O tratamento estatístico foi desenvolvido por procedimentos descritivos (medidas de tendência central e dispersão) e inferenciais (ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls ou Dunnett's) no programa GraphPad Prism 5.0.

Para eHSP70 foi usada normalização com escala logarítmica, com  $\log^{10}$ , para análise por teste estatístico paramétrico (ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Consumo de ração e perfil biométrico

A ovariectomia, a terapia de choque térmico, ou a combinação desses fatores não influenciou o consumo de ração (g/dia) e o respectivo consumo calórico diário (tabela 1).

Em relação ao índice de massa corporal (IMC), não foi observado efeito da ovariectomia e/ou da terapia de choque térmico, entre os grupos experimentais, bem como entre o início e o final do experimento (tabela 1).

**Tabela 1 – Consumo de ração, kJ e IMC**

Grupos experimentais: controle (C), terapia de choque térmico (TCT), ovariectomia (OVX), ovariectomia + terapia de choque térmico (OVX+TCT). Dados expressos em média  $\pm$  DP. N (6-9).

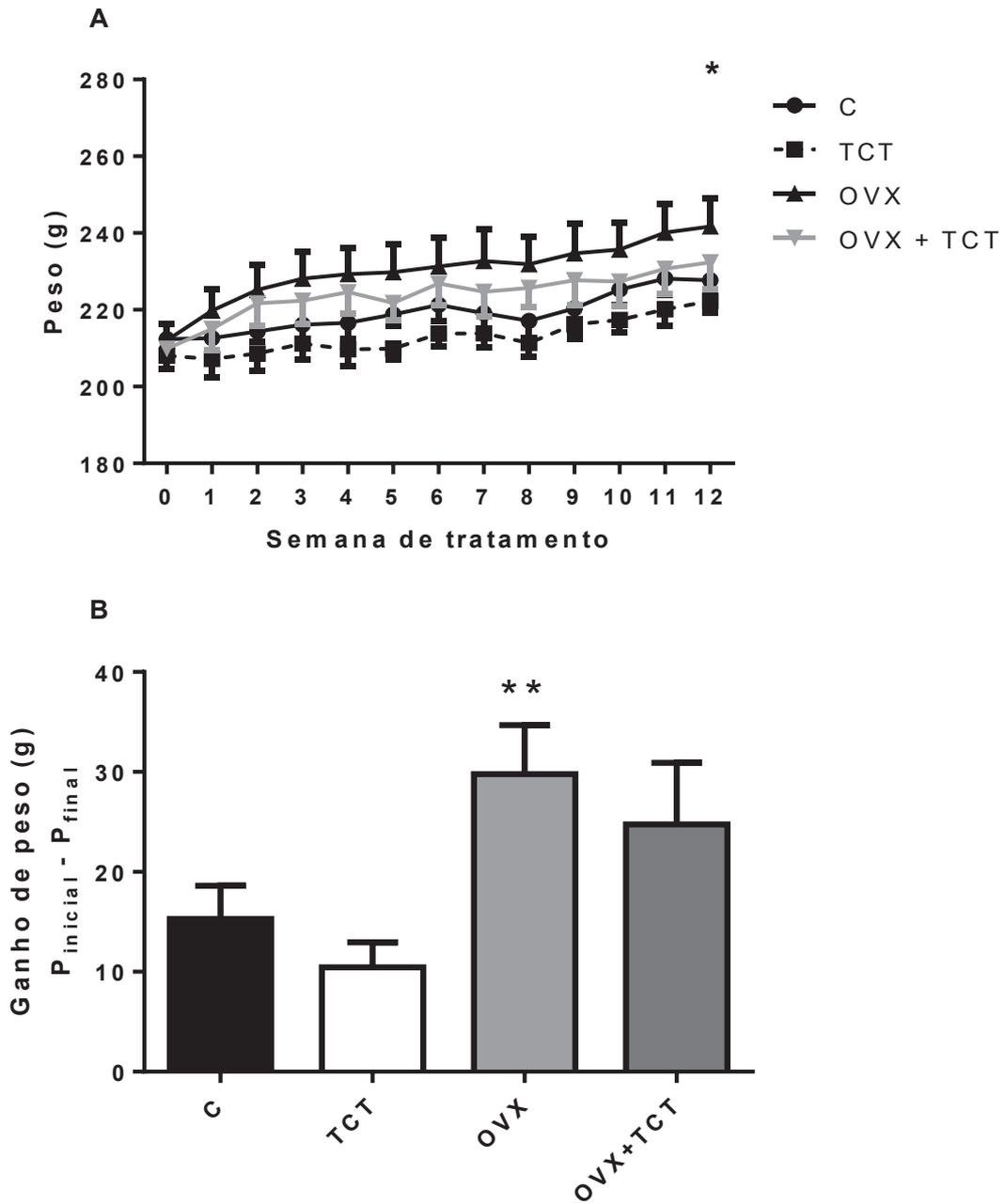
	C	TCT	OVX	OVX+TCT	Anova (valor de P)
<b>Consumo ração</b> g/dia	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	0,4517
	10,1 $\pm$ 0,45	10,6 $\pm$ 0,66	10,4 $\pm$ 1,54	11,2 $\pm$ 0,86	
	167,66 kJ	175,96 kJ	172,67 kJ	185,92 kJ	0,6916
	Final	Final	Final	Final	
12,9 $\pm$ 2,74	14,3 $\pm$ 0,72	13,5 $\pm$ 0,82	12,8 $\pm$ 2,18		
	214,14 kJ	237,38 kJ	224,10 kJ	212,48 kJ	
<b>IMC</b>	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	0,4517
	0,54 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,01	
	Final	Final	Final	Final	0,6916
	0,57 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,04	

Índice de massa corpórea (IMC). Anova de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

Com relação ao peso corporal, se observa o ganho em todos os grupos no decorrer das 12 semanas (figura 1A). Os valores relativos ao ganho total de peso no

período de tratamento, calculado com base no peso do início e do final do tratamento ( $\text{Peso}_{\text{final}} - \text{Peso}_{\text{inicial}}$ ), comparativamente entre os grupos, evidenciam um maior ganho de peso no grupo OVX (figura 1B). As fêmeas ovariectomizadas e submetidas a terapia térmica (grupo OVX + TCT) apresentaram um percentual de ganho de massa de 10,7%, o qual não difere dos grupos C (~7%) e TCT (~5%) (figura 1B).

Figura 1 – Massa corporal

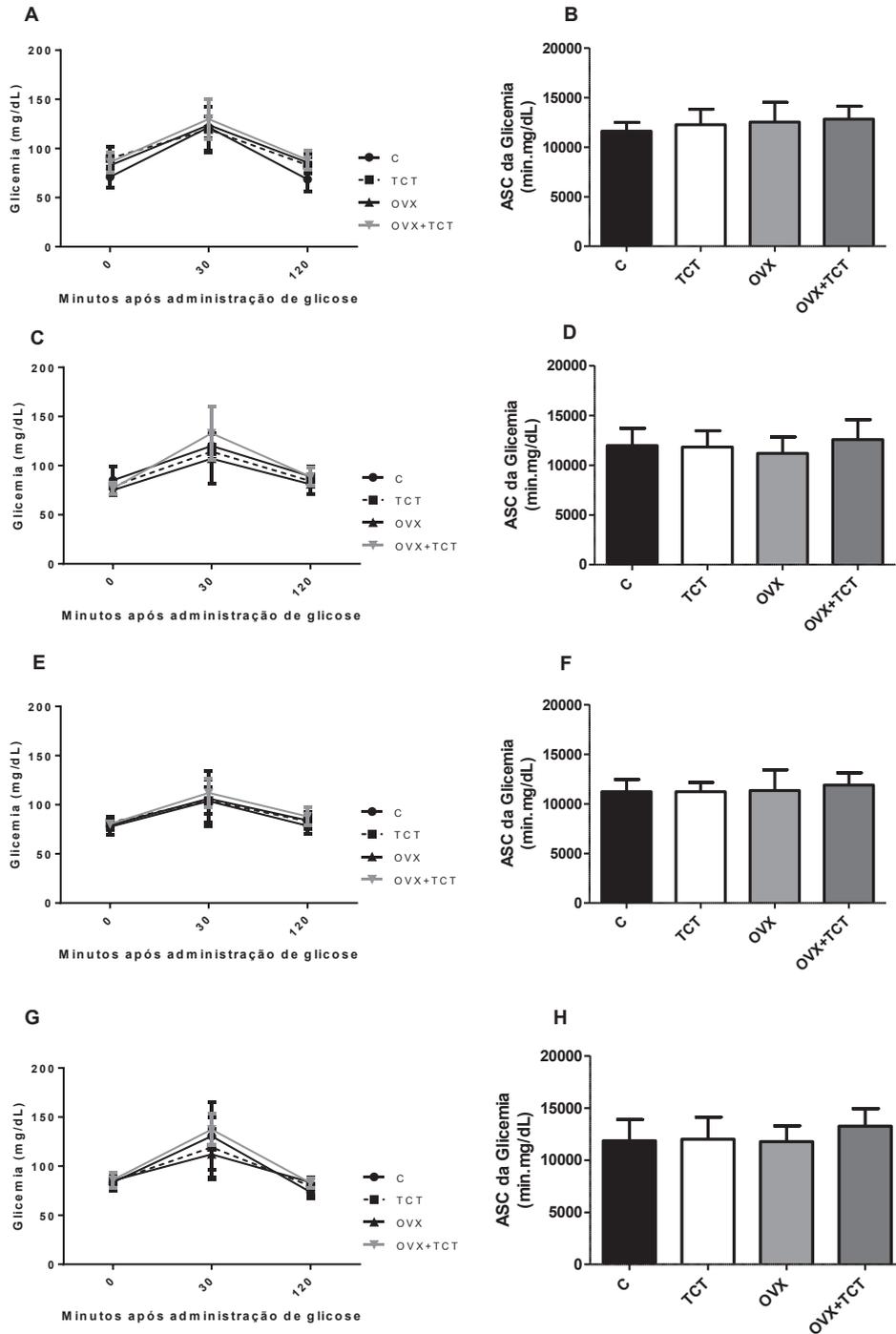


Grupos experimentais: controle (C), terapia de choque térmico (TCT), ovariectomia (OVX), ovariectomia + terapia de choque térmico (OVX+TCT). Dados expressos média  $\pm$  DP. N=(6-9). **1A** Peso corporal ao longo das 12 semanas de tratamento. \*OVX semana 12 vs OVX semana 0. Anova de duas vias, seguida do teste de Tukey,  $P < 0,05$ . **1B** Ganho de massa corporal ao longo das 12 semanas de tratamento (Peso final – Peso inicial). \*\*OVX vs C e OVX vs TCT, Análise de variância, seguido pelo teste de Tukey,  $P < 0,05$ .

## **5.2 Perfil bioquímico e metabólico**

Quanto ao perfil glicêmico todos animais se apresentaram normoglicêmicos em jejum, em qualquer um dos tempos analisados e das condições experimentais. Em relação ao teste de tolerância a glicose não foi observada diferença na resposta glicêmica dos animais nos diferentes tempos e condições experimentais (Figuras 2A - H)

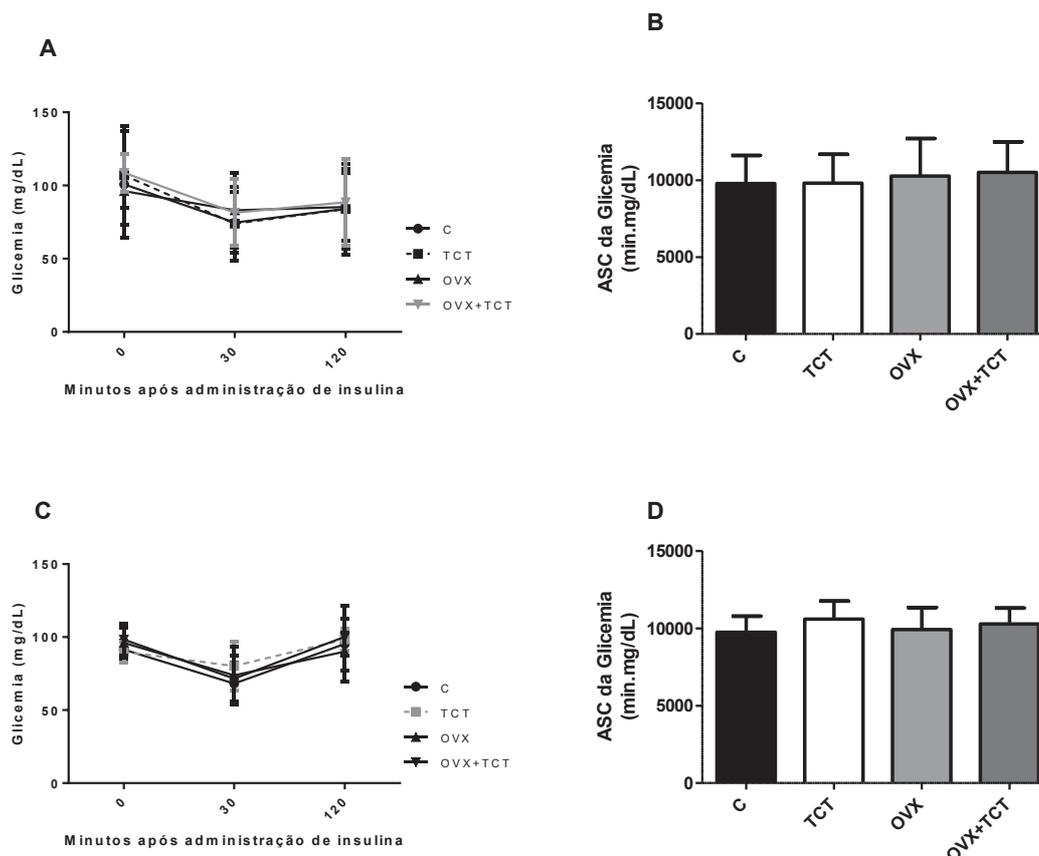
**Figura 2 - Teste de tolerância à Glicose**



**Teste de tolerância a glicose (A, C, E, G) e respectiva área sob a curva (B, D, F, H).** Grupos experimentais: controle (C), terapia de choque térmico (TCT), ovariectomia (OVX), ovariectomia + terapia de choque térmico (OVX+TCT). **2A-B:** Semana zero; **2C-D:** semana quatro; **2E-F:** semana oito; **2G-H:** semana doze, após início do tratamento. Dados expressos em média  $\pm$  DP. N (6-9).

No intuito de avaliar a resposta à insulina, foram realizados testes de tolerância à insulina (IPITT 1 UI/kg), nos quais foi utilizado insulina de ação rápida (Humalog- Lispro), o que induz um rápido declínio da glicemia 30 minutos após sua administração, não foi evidenciado efeito da ovariectomia, da terapia de choque térmico ou da combinação destes fatores neste parâmetro.

**Figura 3 - Teste de Tolerância à Insulina**



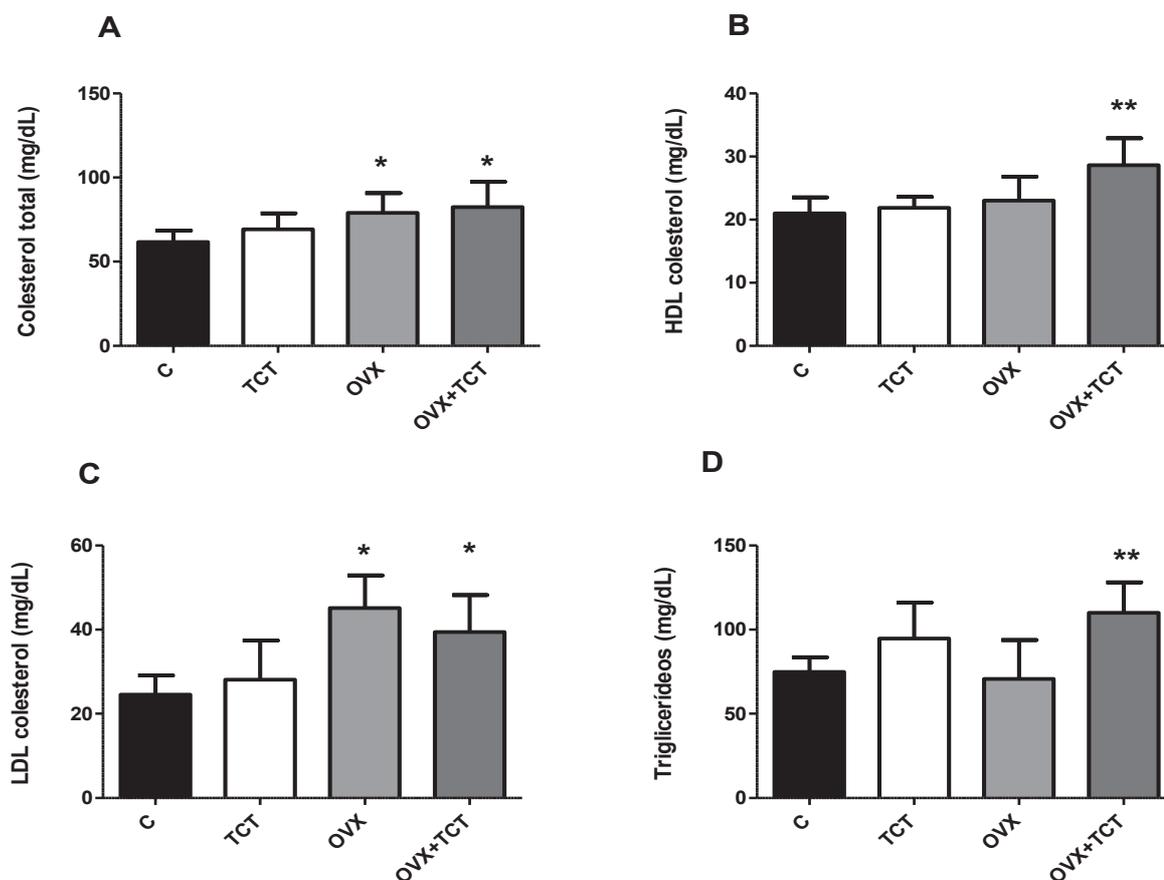
**Teste de tolerância a insulina intraperitoneal (A, C) e respectiva área sob a curva (B, D).** Grupos experimentais: controle (C), terapia de choque térmico (TCT), ovariectomia (OVX), ovariectomia + terapia de choque térmico (OVX+TCT). Resultados descritos em média  $\pm$  DP. N (6-9). **3A-B** Semana zero; **3C-D** Semana dez. Dados expressos em média  $\pm$  DP. N (6-9).

O perfil lipídico foi avaliado a partir de dosagens de colesterol total, suas frações, e triglicerídeos (Figura 4 A-D). Observou-se que a ovariectomia causou aumento na concentração sérica de colesterol total (grupos OVX e OVX + TCT), em relação ao grupo C. A concentração de HDL foi maior no grupo OVX+TCT quando

comparado com todos os demais grupos. Já o perfil da fração LDL colesterol assemelham-se ao comportamento do colesterol total (3C).

Em relação aos triglicerídeos, observa-se uma maior concentração deste lipídeo circulante no grupo OVX + TCT quando comparado os grupos OVX e C (figura 4D).

**Figura 4 - Efeito da terapia térmica em ratas ovariectomizadas sobre a resposta ao perfil lipídico**



Dosagens de colesterol total (CT), colesterol HDL, colesterol LDL e triglicerídeos. Grupos experimentais: controle (C), terapia de choque térmico (TCT), ovariectomia (OVX), ovariectomia + terapia de choque térmico (OVX+TCT). Análise de variância ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. Dados expressos média  $\pm$  DP. N (6-9). **4A** Colesterol total, \* vs C  $P < 0,05$ . **4B** HDL colesterol \*\* vs todos os grupos  $P < 0,05$ . **4C** LDL colesterol \* vs C  $P < 0,01$ . **4D** Triglicerídeos \*\* vs C e OVX  $P < 0,01$ .

### **5.3 Perfil Hematológico e hormonal**

Diferentes parâmetros hematológicos foram analisados, conforme apresentado na Tabela 2. O grupo OVX+TCT apresenta valor médio de leucócitos totais de  $5,63 \times 10^3$  células /  $\text{mm}^3$  de sangue, sendo maior que o grupo C. Semelhantemente, os linfócitos do grupo OVX+TCT apresentam valor médio de superior ao apresentado pelo grupo controle e pelo grupo TCT. As demais variáveis hematológicas não foram diferentes entre os grupos experimentais e os dados hematológicos completos dos grupos estão detalhados na tabela 2.

**Tabela 2 - Parâmetros hematológicos**

Parâmetros Hematológicos dos grupos (C) Controle, (TCT) Terapia de choque térmico, (OVX) ovariectomia, (OVX+TCT) ovariectomia + terapia de choque térmico.					
Grupos					
Parâmetros	C	TCT	OVX	OVX+TCT	ANOVA (valor de P)
WBC ( $10^3/\text{mm}^3$ )	4,40±0,90	4,65±0,93	4,55±0,22	5,63±0,420*	0,0246
Bastão (unidade)	47±9	54±16	48±6	56±4	0,1078
Neutrófilo (unidade)	412±64	398±57	413±164	427±148	0,9824
Eosinófilo (unidade)	19±25	9±19	0,00	7±20	0,2399
Monócitos (unidade)	216±27	242±97	197±39	219±33	0,5038
Linfócitos (unidade)	3646±731	3724±578	4050±435	4898±529**	0,0021
%Bastão	1,14±0,37	1,33±0,5	1±0	1±0	0,1228
%Neutrófilo	11,3±4,00	13,3±6,10	10,2±3,80	8,2±3,71	0,1787
%Eosinófilo	0,42±0,53	0,22±0,44	0±0	0,14±0,37	0,1915
%Monócito	4,42±0,78	4,55±0,88	4,22±0,66	3,71±0,75	0,1900
%Linfócito	83,0±3,7	80,6±6,8	85,2±3,7	87,0±4,6	0,0944
RBC ( $10^6/\text{mm}^3$ )	6,78±0,59	6,62±1,33	7,14±1,07	6,63±0,88	0,6957
HBG (g/dL)	14,4±1,04	13,8±0,37	14,6±1,14	13,9±1,08	0,3516
HCT (%)	37,5±2,99	35,6±6,37	38,8±4,15	36,7±3,09	0,5208
PLT ( $10^3/\text{mm}^3$ )	664±81	621±111	660±58	638±99	0,7472
MCV ( $\text{fm}^3$ )	55,3±1,70	54,1±2,20	54,7±3,45	55,4±3,45	0,7335
MCH (pg)	21,3±0,91	21,1±1,62	20,7±1,55	21,1±1,31	0,8166
MCHC (g/dL)	38,8±0,79	38,3±1,22	37,8±1,40	38,1±0,74	0,4335
RDW (%)	13,84±0,87	13,6±0,83	13,7±0,80	13,9±0,50	0,1787

**Dosagem de hemograma.** Grupos experimentais: controle (C), terapia de choque térmico (TCT), ovariectomia (OVX), ovariectomia + terapia de choque térmico (OVX+TCT). Leucócito (WBC); Eritrócitos (RBC); Hemoglobina (HBG); Hematócrito (HCT); Volume corpuscular médio (MVC); Hemoglobina corpuscular média (MCH); Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC); Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW). ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. Resultados descritos em média ± DP. N (7-9). Leucócitos \* vs C P<0,05; Linfócitos \*\* vs C e TCT P<0,00.

No final do período experimental (13 semanas após ovariectomia) os animais dos grupos ovariectomizados apresentaram uma redução hormonal de 20% na concentração circulante de 17 $\beta$  estradiol, em relação aos que foram submetidos a falsa cirurgia, conforme expresso na tabela 3.

**Tabela 3 – Dosagem sérica de 17 $\beta$ -estradiol**

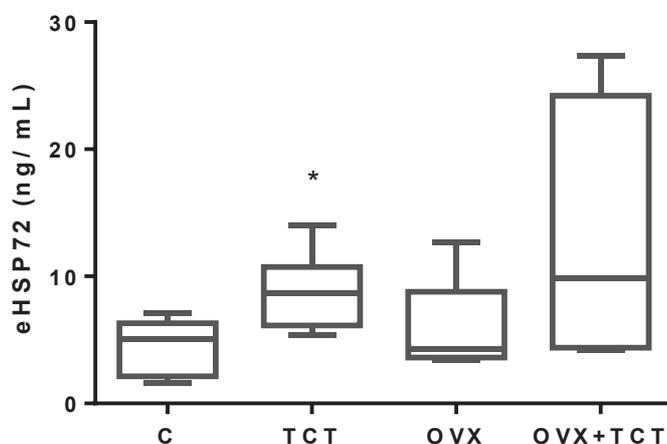
Dosagem sérica de 17 $\beta$ -estradiol					
Variável	Grupos				Valor de P
17 $\beta$ -estradiol (pg/ml)	C	TCT	OVX *	OVX+TCT*	
> 11.8 (pg/ml)	5	4	1	1	0,0248
< 11.8 (pg/ml)	0	4	5	4	

Grupos experimentais: controle (C), terapia de choque térmico (TCT), ovariectomia (OVX), ovariectomia + terapia de choque térmico (OVX+TCT). 17 $\beta$ -estradiol \* vs C, P<0,05, ANOVA de uma via, seguido pelo Teste de Tukey.

#### 5.4 Expressão de HSP70

Na figura 5 encontram-se apresentados os dados relativos a concentração plasmática de eHSP72. Observa-se um aumento na concentração de eHSP72 circulante nos animais submetidos a terapia térmica (TCT vs C) porém, este efeito da terapia de choque térmico não é detectado entre os grupos de animais ovariectomizados (OVX vs OVX+TCT).

**Figura 5 - Concentração plasmática de eHSP72**



**Concentração plasmática de eHSP72**, por metodologia de ELISA. Grupos experimentais: controle (C), terapia de choque térmico (TCT), ovariectomia (OVX), ovariectomia + terapia de choque térmico (OVX+TCT). Resultados descritos em média  $\pm$  DP. N (4-9). ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. \* C vs TCT para  $P < 0,05$ .

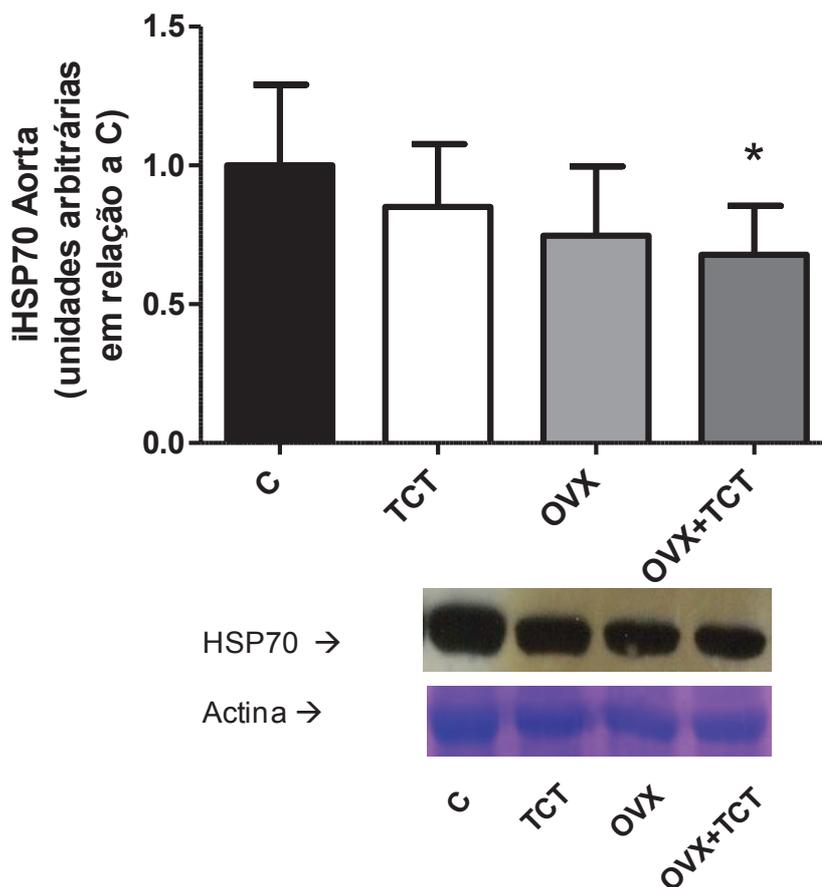
### **5.5 Parâmetros de estresse oxidativo e expressão de HSP70 nos tecidos aórtico, hepático, muscular (gastrocnêmio) e adiposo.**

A resposta tecidual ao estresse, nos tecidos hepático, adiposo, muscular e aorta, foi avaliada a partir da análise de parâmetros de estresse oxidativo (lipoperoxidação e atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante SOD e CAT) e da concentração de HSP70 intracelular (iHSP70).

### 5.5.1 Tecido aórtico

A figura 6 apresenta a concentração de HSP70 no **tecido aórtico** 48 horas após a última sessão de choque térmico, e indica que a concentração desta proteína é significativamente menor (32%) no grupo OVX + TCT quando comparado ao grupo controle (C), não diferindo dos demais grupos. A concentração de HSP70 no grupo OVX, apesar de não ser significativa, representa 25% a menos em relação ao grupo controle ( $p = 0,0821$ ). Não se observa diferença na expressão de HSP70 entre os grupos C e TCT.

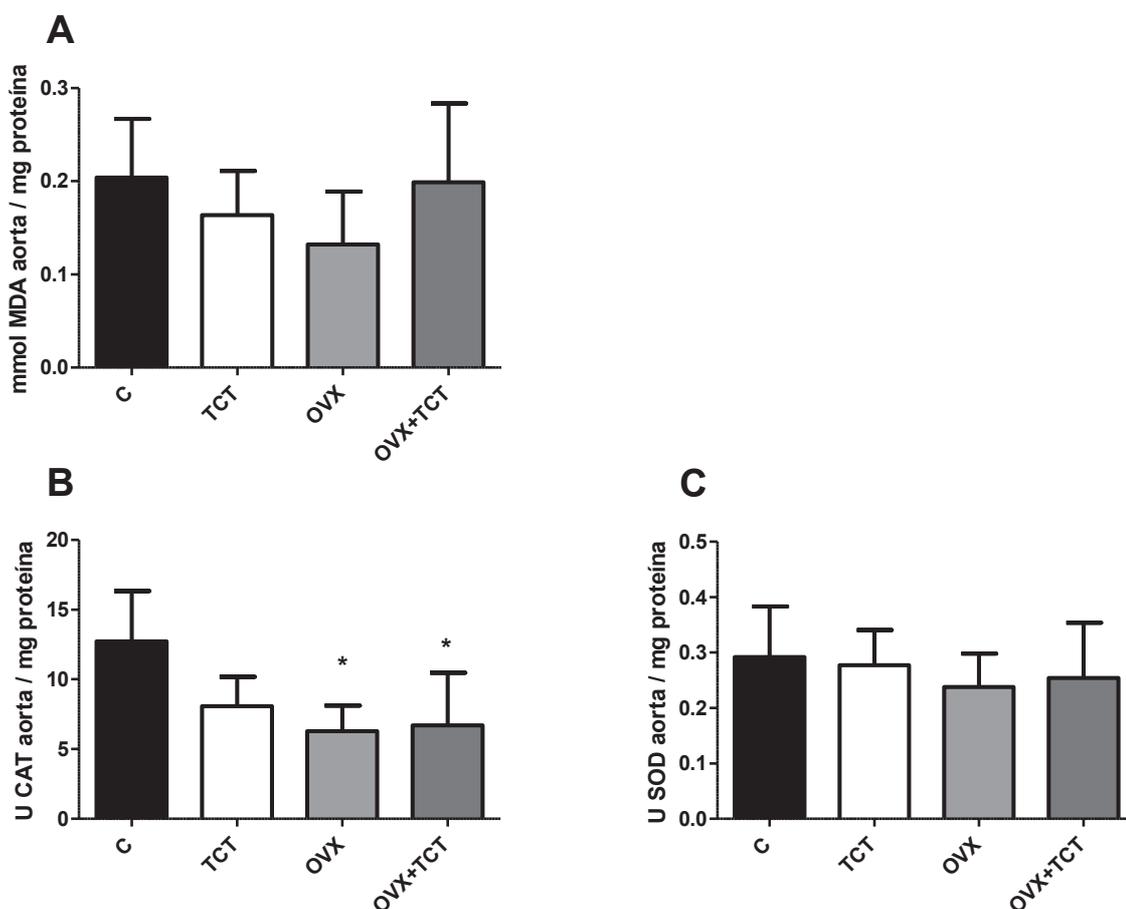
Figura 6- Concentração de iHSP70 no tecido aórtico



Valores de iHSP70 normalizados pelo conteúdo celular e actina. Grupos experimentais: Controle (C), Terapia de Choque Térmico (TCT), Ovariectomia (OVX), Ovariectomia + Terapia de Choque Térmico (OVX+TCT). Resultados expressos como média  $\pm$  DP. N (6-9). ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. \* vs C,  $P < 0,05$ .

Com relação a lipoperoxidação no **tecido aórtico** (figura 7A), não houve alteração em nenhum dos grupos experimentais, contudo, observa-se menor atividade da enzima CAT nos grupos de animais ovariectomizados (OVX e OVX+TCT) em relação ao grupo C (7B). Não foi observado mudança na atividade da enzima SOD em nenhum dos grupos experimentais, neste tecido (7C).

**Figura 7 - Parâmetros de estresse oxidativo no tecido aórtico**

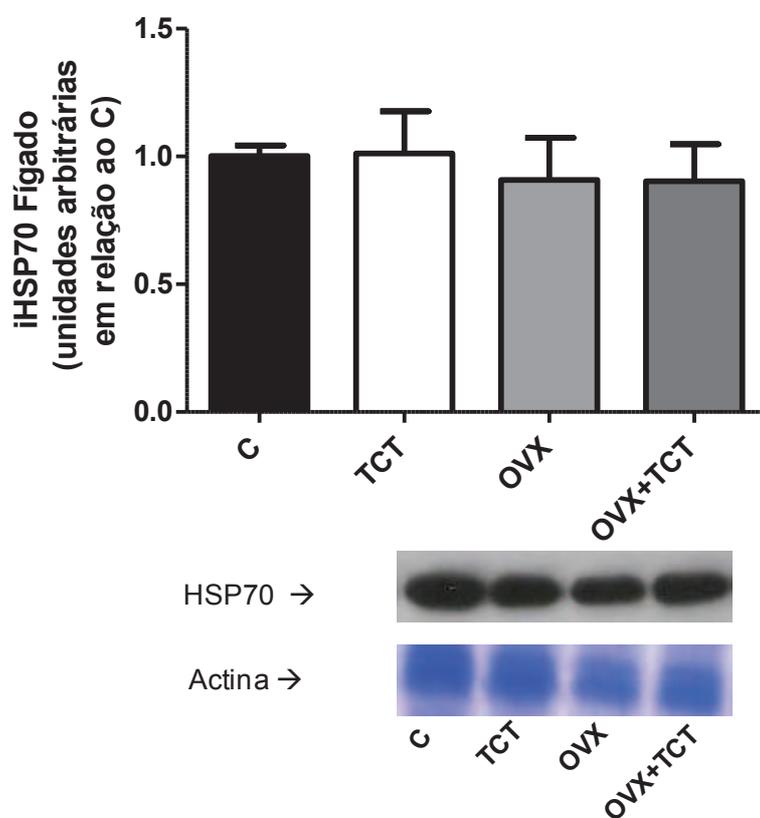


**Grupos experimentais:** Controle (C), Terapia de Choque Térmico (TCT), Ovariectomia (OVX), Ovariectomia + Terapia de Choque Térmico (OVX+TCT). Resultados expressos como média  $\pm$  DP. N (6-9). **7A TBARS**, ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. **7B CAT**, ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. \* vs controle,  $P < 0,05$ . **7C SOD**, ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey.

### 5.5.2 Tecido hepático

Em relação ao **tecido hepático**, os valores relativos ao conteúdo intracelular de HSP70 indicam não haver diferença neste parâmetro entre os grupos experimentais, no tempo de 48 horas após a última sessão de choque térmico (figura 8).

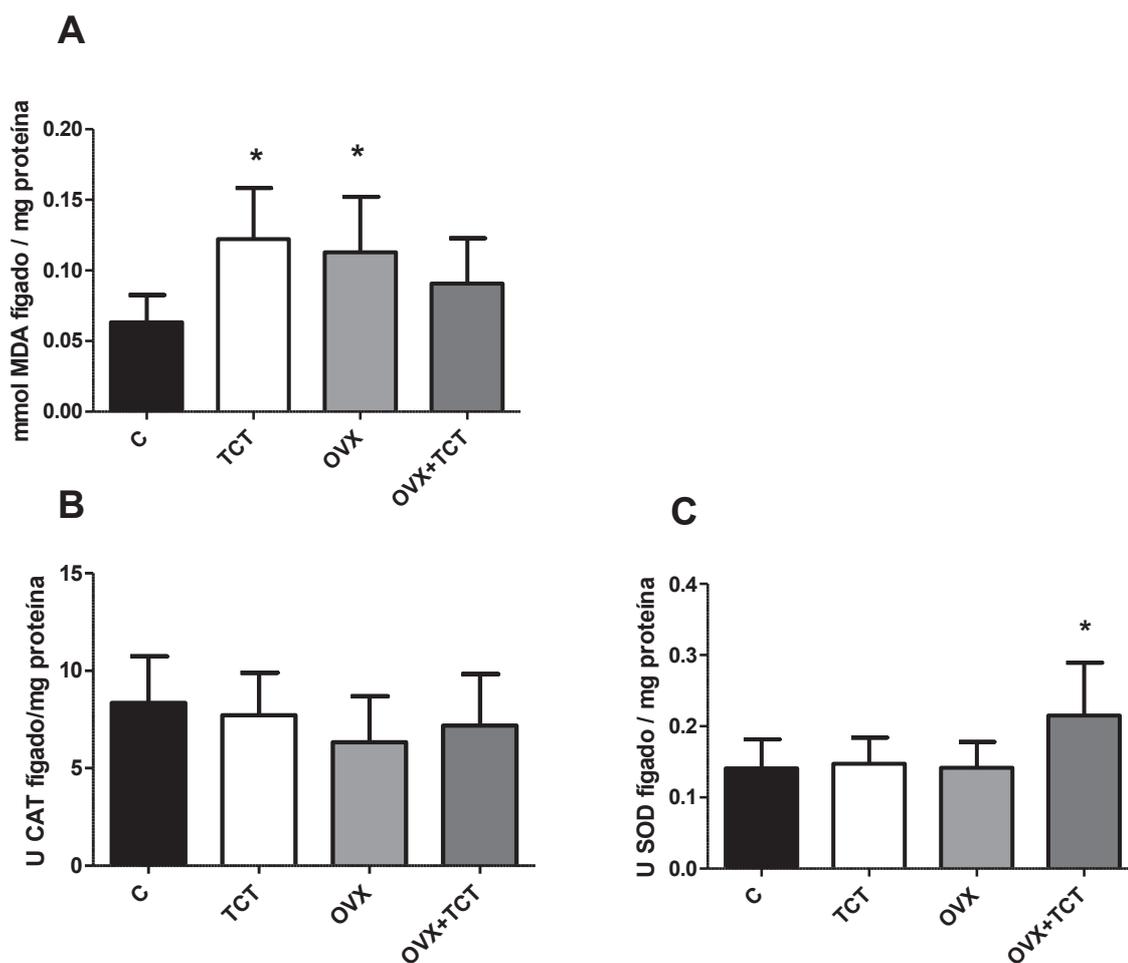
**Figura 8 - Concentração de iHSP70 no tecido hepático**



Valores de iHSP70 normalizados pelo conteúdo celular e actina. Grupos experimentais: Controle (C), Terapia de Choque Térmico (TCT), Ovariectomia (OVX), Ovariectomia + Terapia de Choque Térmico (OVX+TCT). Resultados expressos como média  $\pm$  DP. N (6-9) ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey.

Os parâmetros de estresse oxidativo no **tecido hepático** apresentam-se alterados quanto atividade da enzima SOD (figura 9C), que está aumentada no grupo OVX + TCT comparada ao grupo controle (C). Quanto ao nível de lipoperoxidação (figura 9A), observa-se que um aumento nos grupos OVX e TCT comparados ao grupo controle (C).

**Figura 9 - Parâmetros de estresse oxidativo no tecido hepático**



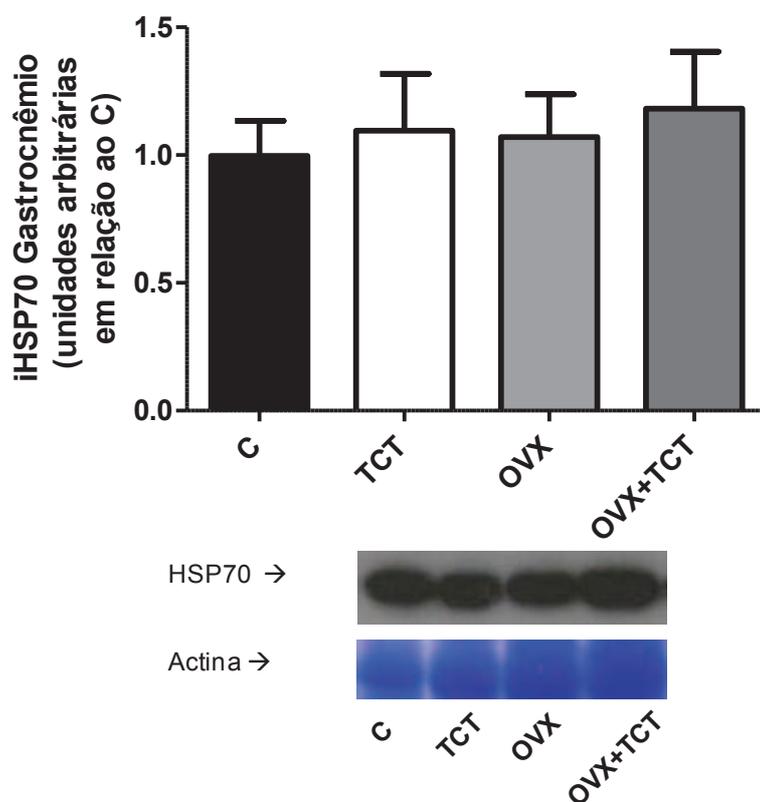
Grupos experimentais: Controle (C), Terapia de Choque Térmico (TCT), Ovariectomia (OVX), Ovariectomia + Terapia de Choque Térmico (OVX+TCT). Resultados expressos como média  $\pm$  DP. N (6-9). **9A** TBARS, ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey: \* vs C  $P < 0,01$ . **9B** CAT, ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. **9C** SOD, ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. \* vs controle  $P < 0,05$ .

Também foram dosadas as enzimas hepáticas, cujos resultados indicam não haver diferença entre os grupos experimentais: **ALT (UI)**: C (97,6±15,7); TCT (88,6±17,9; OVX (93,4±7,5) e OVX+TCT (83,2±7,4)  $p= 0,4611$ ; **AST (UI)**: C (432,4±80,4); TCT (385,2±76,3); OVX (372,3±44,7); OVX+TCT (380,2±27,9)  $p= 0,4375$ .

### 5.5.3 Tecido muscular

O conteúdo **muscular** (gastrocnêmio) de iHSP70 48 horas após a última sessão de choque térmico apresenta valores similares entre os diferentes grupos experimentais (figura 10).

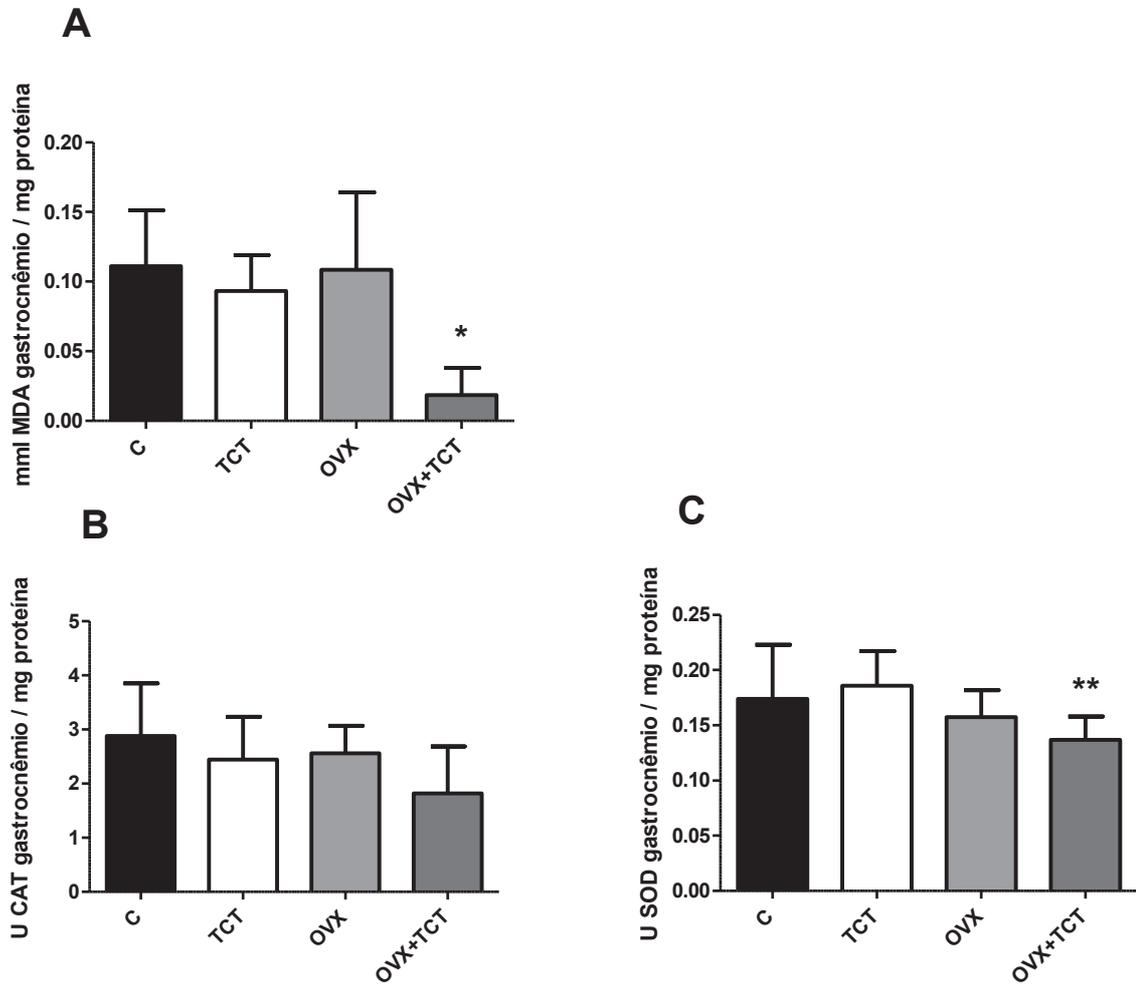
**Figura 10 – Concentração de iHSP70 no tecido muscular**



Valores de iHSP70 normalizados pelo conteúdo celular e actina. Grupos experimentais: Controle (C), Terapia de Choque Térmico (TCT), Ovariectomia (OVX), Ovariectomia + Terapia de Choque Térmico (OVX+TCT). Resultados expressos como média  $\pm$  DP. N (6-9). ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey.

Quanto aos parâmetros de estresse oxidativo no **músculo gastrocnêmio** (figura 11), observa-se menor lipoperoxidação no grupo OVX + TCT em comparação ao demais grupos experimentais (figura 11A). Contudo, é evidenciado menor atividade da enzima superóxido dismutase (figura 11C) no grupo OVX + TCT em comparação ao grupo TCT, sem diferir dos demais grupos experimentais.

**Figura 11 - Parâmetros de estresse oxidativo no tecido muscular (gastrocnêmio)**

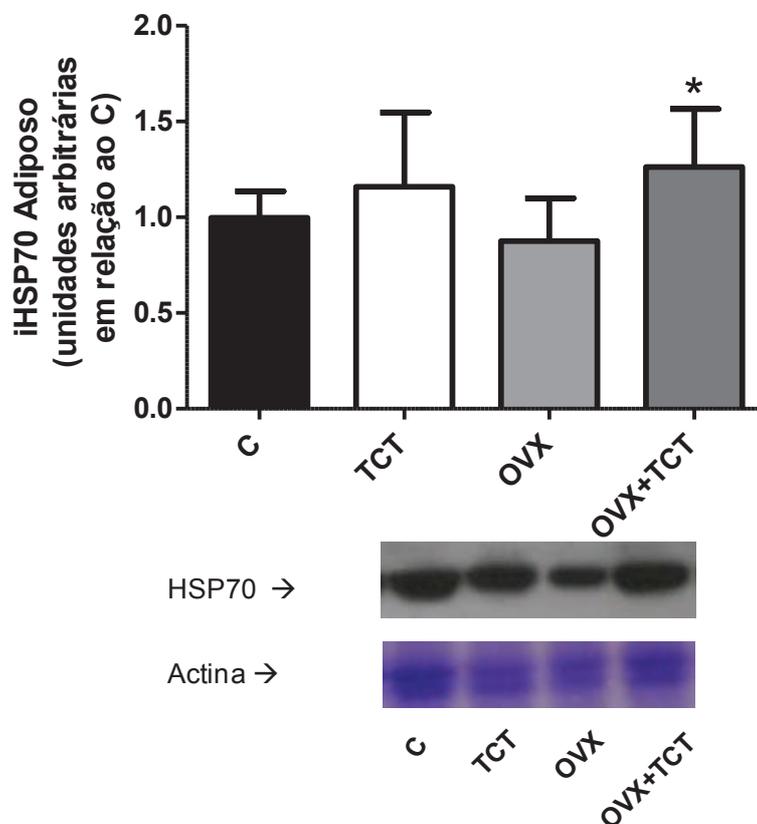


Grupos experimentais: Controle (C), Terapia de Choque Térmico (TCT), Ovariectomia (OVX), Ovariectomia + Terapia de Choque Térmico (OVX+TCT). Resultados expressos como média  $\pm$  DP. N (6-9). **11A TBARS**, ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey: \* vs C, TCT e OVX,  $P < 0,01$ . **11B CAT**, ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. **11C SOD**, ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. \* vs TCT  $P < 0,05$ .

#### 5.5.4 Tecido adiposo

O conteúdo de iHSP70 no **tecido adiposo** (figura 12), 48 horas após a última sessão de choque térmico, revela aumento da expressão desta proteína no grupo OVX+TCT ( $p= 0,0171$ ) vs OVX. Os demais grupos não apresentam alterações significativas nesta variável.

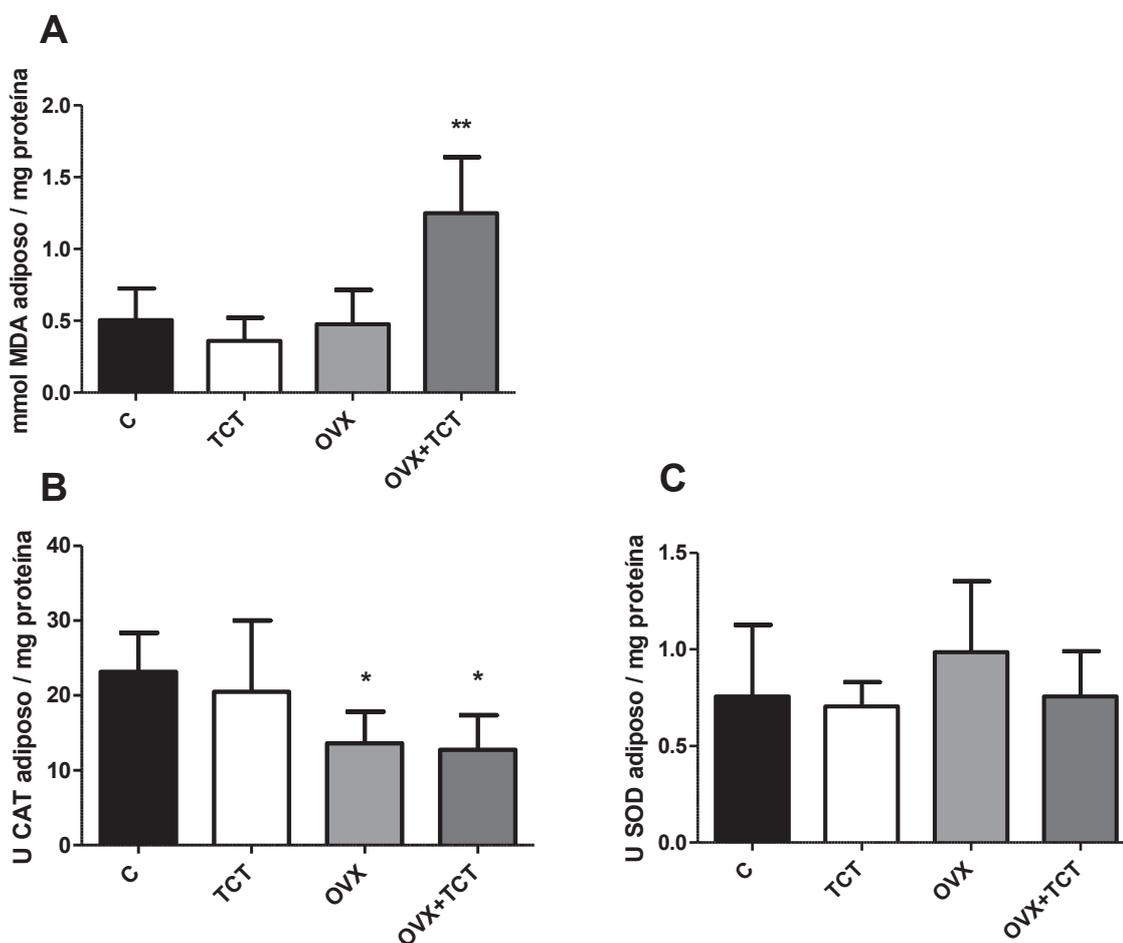
Figura 12 – Concentração de iHSP70 no tecido adiposo



Valores de iHSP70 normalizados pelo conteúdo celular e actina. Grupos experimentais: Controle (C), Terapia de Choque Térmico (TCT), Ovariectomia (OVX), Ovariectomia + Terapia de Choque Térmico (OVX+TCT). Resultados expressos como média  $\pm$  DP. N (6-9). ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. \* vs OVX,  $P < 0,0$

Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo no **tecido adiposo** (figura 13), observa-se aumento da concentração de MDA, indicando maior nível de lipoperoxidação no grupo OVX + TCT vs C, bem como, uma menor concentração da enzima CAT nos grupos de animais ovariectomizados (OVX e OVX + TCT) quando comparado ao grupo controle (C e TCT).

**Figura 13 - Parâmetros de estresse oxidativo no tecido adiposo**

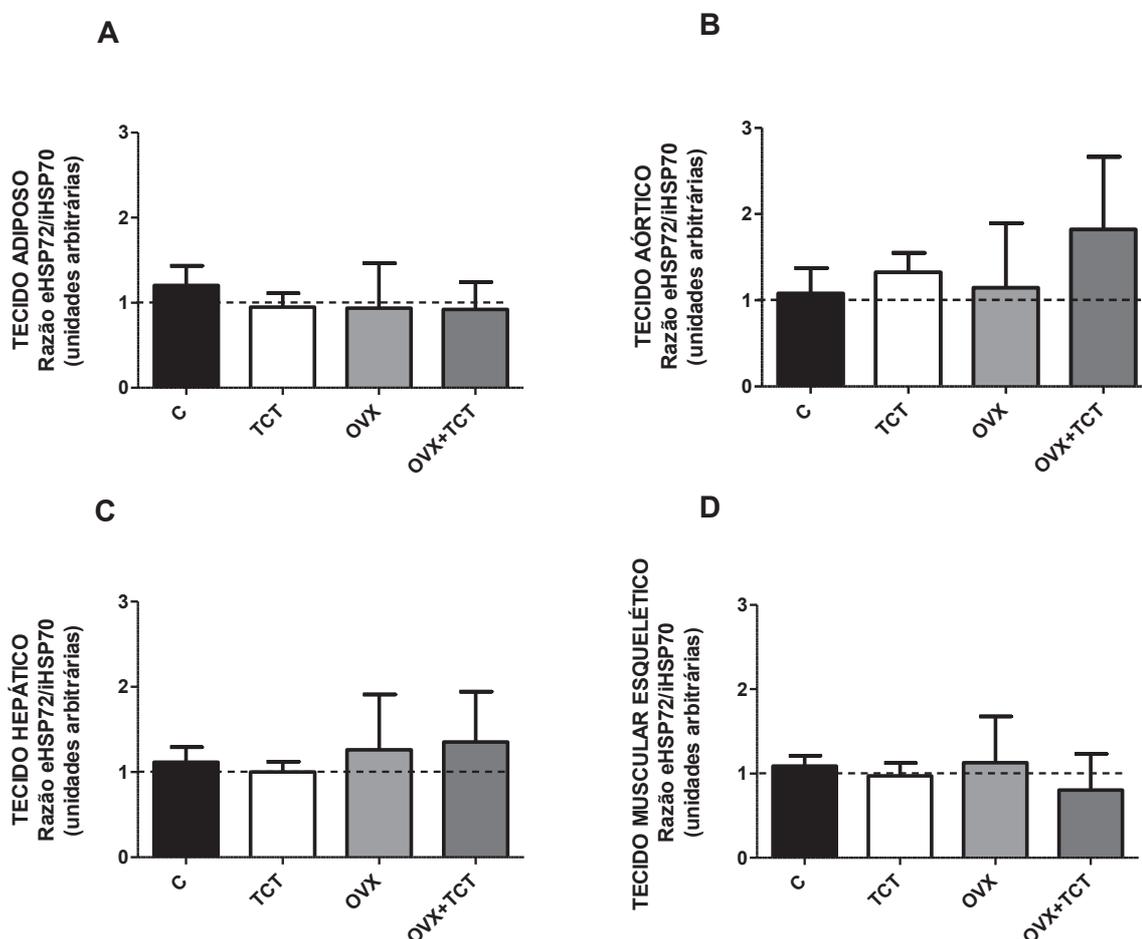


Grupos experimentais: Controle (C), Terapia de Choque Térmico (TCT), Ovariectomia (OVX), Ovariectomia + Terapia de Choque Térmico (OVX+TCT). Resultados expressos como média  $\pm$  DP. N (6-9). **13A** TBARS, ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey: \*\* vs C e TCT,  $P < 0,01$ . **13B** CAT, ANOVA seguido pelo Teste de Tukey: \* vs controle.  $P < 0,05$ . **13C** SOD, ANOVA seguido pelo Teste de Tukey.

## 5.6 Índice H – razão eHSP70 / iHSP70.

Com base na concentração extracelular circulante de HSP70 (eHSP70) e no conteúdo de HSP70 de cada tecido (aórtico, hepático, muscular e adiposo), foi calculado e analisado o Índice H (conforme descrição no item 4.21.1), a fim de estimar o estado imune nas diferentes condições experimentais. Os valores relativos a este índice não revelam diferenças entre os grupos experimentais, 48 horas após a última sessão de choque térmico (figura 14).

Figura 14 – Índice H - razão eHSP72 / iHSP70



Grupos experimentais: Controle (C), Terapia de Choque Térmico (TCT), Ovariectomia (OVX), Ovariectomia + Terapia de Choque Térmico (OVX+TCT). Resultados expressos como média  $\pm$  DP. N (6-9). **14A** Tecido adiposo; **14B** tecido aórtico; **14C** Tecido hepático; **14D** Tecido muscular.

## 6 DISCUSSÃO

Estudos acerca da temática da menopausa, em mulheres e/ou em modelos de animais ovariectomizados, têm se tornado cada vez mais relevantes no cenário do mundo moderno. Ocorrências clínicas como obesidade ou sobrepeso, dislipidemia, resistência insulínica e doença aterosclerótica, associadas com alterações na massa e composição corporal, são frequentemente relatadas em mulheres pós-menopáusicas, podendo estar relacionadas com o estilo de vida moderno, especialmente pelo consumo de dietas hipercalóricas e o sedentarismo (NELSON, H. D., 2008; SHOENACKER et al., 2014; NAHAS et al., 2014) e/ou com a baixa disponibilidade de estrogênio *per se* (HEINE et al., 2000; CLEGG et al., 2003; CAMPOREZ et al., 2013; GEIGER; GUPTA, 2013; MIRAGEM et al., 2015).

No presente estudo foram analisados parâmetros biométricos, bioquímicos, hematológicos, do estado redox e da resposta celular ao estresse, em animais mantidos em condições normais de alimentação para ratos de laboratório, porém, ovariectomizados e submetidos à terapia de choque térmico. Neste cenário, todos os grupos experimentais apresentaram aumento na massa corporal ao longo das 12 semanas de tratamento (figura 1B). Contudo, o grupo OVX foi o único a apresentar aumento significativo de peso ( $P < 0,05$ ) entre a primeira a última semana de tratamento (figura 1A) e este efeito foi atenuado no grupo submetido a terapia de choque térmico (OVX + TCT). Ainda, o grupo OVX apresentou percentual de ganho de peso maior (ganho de 14,0 %) quando comparado ao grupo controle (7,2 %) e ao grupo TCT (4,9 %) (figura 1B). Cabe destacar aqui que, a variação no ganho de peso observada ocorreu independentemente do consumo calórico, tendo em vista que todos os grupos consumiram ração padrão (11,4 % gordura, 62,8% de carboidrato e 25,8% de proteína) e não apresentaram diferença no consumo calórico médio diário semelhante (tabela 1).

Estes dados sugerem o efeito direto da falta de estrogênio sobre a regulação do peso corporal e corroboram com outros estudos realizados em humanos e modelos experimentais (SIBONGA et al., 2003; SPANGENBURG; JACKSON, 2013),

os quais mostram que a falta de estrogênio *per se* influencia a regulação e a manutenção do peso corporal, a favor do seu aumento, o que pode estar relacionado ao menor dispêndio de energia (HEINE et al, 2000; CAMPOREZ et al., 2013).

Quanto ao efeito da terapia de choque térmico sobre parâmetros biométricos, observa-se que animais ovariectomizados e submetidos a terapia de choque térmico (OVX + TCT) apresentaram ganho de peso corporal semelhante ao dos grupos não ovariectomizados (C e TCT) (figura 1B), diferentemente do grupo OVX (figura 1B), o que pode sugerir um efeito protetor da terapia de choque térmico sobre o ganho de peso corporal em organismos com baixa disponibilidade de estrogênio. A terapia térmica, como sauna e banho quente de imersão (ofurô), vem se tornando uma prática terapêutica frequente. Estudos tem sugerido benefícios na prevenção e controle de doenças cardiometabólicas (KRAUSE et al., 2015a) e diabetes mellitus (HOOPER, 1999). Além disso, o efeito benéfico sobre o controle do peso corporal, pode estar relacionado à expressão de HSP72 (forma induzível da HSP70), tendo em vista que foi observado que a superexpressão desta proteína no músculo esquelético impede o aumento do peso corporal induzido pela dieta hiperlipídicas. Esse efeito parece ser decorrente de um aumento na atividade enzimática mitocondrial, sugerindo que a expressão de HSP72 tecidual possa ter efeito sobre o gasto de energia (CHUNG et al., 2008).

Este efeito da terapia térmica tem relevância quando pensada como estratégia não farmacológica para o período pós-menopausa, onde ocorre geralmente aumento da massa corporal e da gordura visceral, que estão fortemente correlacionadas com aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer de mama e diabetes mellitus tipo 2 (CHEN et al., 2005).

Os efeitos da ovariectomia e da terapia de choque térmico sobre o metabolismo de nutrientes, como glicose e lipídios circulantes, foram também avaliados em nosso estudo. Os resultados mostram que, apesar da ovariectomia, todos animais apresentaram normoglicemia de jejum, em quaisquer dos tempos e condições experimentais. Do mesmo modo, a resposta glicêmica nos testes de tolerância a glicose e à insulina se apresentam dentro de parâmetros normais, não

havendo diferença entre os grupos e nos tempos de análise (Figuras 2 e 3). Apesar de estudos evidenciarem que a falta de estrogênio pode estar associada com prejuízos no metabolismo da glicose (HEINE et al., 2000), em nosso estudo não foram observadas alterações no perfil glicêmico em razão da ovariectomia e/ou terapia de choque térmico, mesmo associado com outras alterações biométricas, como ganho de peso, e bioquímicas.

Com o declínio dos níveis de estrogênio também pode emergir ou agravar dislipidemias, como a elevação dos níveis de triglicérides e colesterol, resultando na predominância de partículas densas de LDL e a redução das partículas antiaterogênicas, a HDL (CARR, 2003). Os resultados das análises bioquímicas relativas ao perfil lipídico em nosso estudo (figura 4) confirmam concentração maior de colesterol total nos animais ovariectomizados comparado aos grupos não ovariectomizados (figura 4A).

Jensen e colaboradores (1990), mostram que, seis meses após a menopausa, os níveis de colesterol total (CT) e a fração LDL se elevam entre 5 e 10% e, em dois anos, a fração HDL diminui em aproximadamente 6%. No modelo experimental, a elevação da colesterolemia foi observada 13 semanas após a ovariectomia e em relação as frações de colesterol também ocorreram modificações. Os resultados da fração LDL colesterol mostram um aumento de 83,4% desta lipoproteína no grupo OVX, em relação ao controle (C) (figura 4C). Quanto a fração HDL colesterol, observa-se um desfecho importante quando se comparam os grupos de animais ovariectomizados com e sem terapia de choque térmico: os animais submetidos a terapia térmica (OVX + TCT) apresentam maior concentração desta lipoproteína comparado ao grupo OVX, sendo a diferença de cerca de 24% a mais no grupo OVX + TCT (figura 4B).

O aumento da fração HDL colesterol pode representar um importante fator de proteção cardiovascular, especialmente em organismos mais susceptíveis ao desenvolvimento de anormalidade e agravos metabólicos, como é o caso em estudo. Em um estudo de investigação mostra que o aumento de 1 mg/dL na concentração de HDL colesterol corresponde a uma redução de 3,2% no risco de doença coronariana, em mulheres na menopausa (STEVENSON, CROOK, GODLANDS, 1993). Neste contexto, o resultado obtido com o grupo OVX + TCT

pode representar um importante benefício da terapia de choque térmico em organismos com baixa disponibilidade de E2, mais susceptíveis ao desenvolvimento de alterações aterogênicas.

A terapia de choque térmico é utilizada como um fator de indução da expressão de proteínas de choque térmico como a HSP70 (KAMPINGA et al., 2009; HECK; SCHOLLER; BITTENCOURT, 2011). O estudo de Zhu e colaboradores (2003), mostrou que o aumento dos níveis séricos de HSP70 são associados ao baixo risco de doença arterial coronariana. Outro estudo, com culturas de células endoteliais, sugere que a HSP70 possa estar envolvida em mecanismos de defesa contra a atividade tóxica da LDL oxidada, principal causadora da formação da placa aterosclerótica, sugerindo uma função protetora da HSP70 no desenvolvimento de doença coronariana (HAHN et al., 1990).

Entretanto, se por um lado a terapia térmica parece produzir efeito protetor cardiovascular em ratas ovariectomizadas, considerando a maior concentração de HDL no grupo OVX + TCT (em relação ao OVX), por outro, parece interferir negativamente sobre a concentração de triglicerídeos, uma vez que o grupo OVX + TCT apresentou maior concentração deste lipídeo circulante quando comparado aos grupos OVX e C (figura B). Triglicerídeos são lipídios que predominam no núcleo dos quilomícrons, gerados a partir dos lipídeos da dieta, ou no núcleo das proteínas de muito baixa densidade (VLDL), originadas no fígado, a partir de ácidos graxos livres (AGL). A maioria dos quilomícrons são removidos do sangue circulante pelo tecido adiposo ou pelo fígado, os quais contêm grandes quantidades da enzima lipase lipoproteica (LPL), que hidrolisa os TG dos quilomícrons, liberando ácidos graxos e glicerol (GUYTON & HALL, 2015).

De um modo geral, a concentração dos nutrientes no sangue é extremamente controlada pelo fígado, que os capta e distribui, sendo ele o órgão central da manutenção da homeostasia de lipídeos. É um importante órgão exportador de TG para a circulação e tecidos periféricos e pode, portanto, estar envolvido na resposta observada no grupo de animais ovariectomizados expostos a terapia de choque térmico. A concentração elevada de triglicerídeos, observada nesse estudo, no grupo OVX + TCT, pode estar associada também à diminuição da atividade da enzima lipase lipoprotéica. Entre os fatores reguladores da atividade da LPL no

tecido adiposo está a disponibilidade de outros nutrientes como a glicose e a presença de hormônios, como catecolaminas adrenalina e noradrenalina. A adrenalina estimula a lipólise no tecido adiposo e a liberação de ácidos graxos na circulação (GUYTON & HALL, 2015).

Estudo realizado por Tomiyama et al., (2015), no qual indivíduos saudáveis foram submetidos a uma sessão diária (20 minutos) de terapia térmica, por sete dias, mostra que, após uma semana de tratamento, o nível sanguíneo de adrenalina e cortisol diminuiu, indicando a supressão da atividade do sistema nervoso simpático pela terapia térmica. Assim, como hipótese, pois não mensuramos a concentração circulante de catecolaminas, pode-se supor que a terapia de choque térmico possa estar causando redução na concentração desses hormônios (catecolaminas) e de que esta redução possa ter implicações sobre a lipólise e conseqüentemente, sobre a concentração de TG circulante observada neste estudo.

Por outro lado, estudos realizados em adipócitos *in vitro*, mostram que o choque térmico aumenta a expressão de genes envolvidos na captação de ácidos graxos e na síntese de TG e, conseqüentemente, o armazenamento de TG em adipócitos (QU; DONKIN; AJUWON, 2015). Ainda, estudos realizados por Van De Velde e colaboradores (2016), mostram que terapia térmica melhora no nível de triglicerídeos em homens saudáveis, porém isso ocorre quando a terapia térmica é associada com exercício físico. Neste contexto, parece que a combinação de ambas terapias, terapia térmica e exercício físico, possa gerar benefício maior sobre o perfil lipídico, do que a terapia térmica isoladamente.

Os parâmetros hematológicos também foram avaliados nesta investigação, tendo em vista estudos que mostram que a diminuição da concentração de estrogênio pode comprometer o funcionamento do sistema imune, com declínio da quantidade de linfócitos T e B, com conseqüências sobre o desenvolvimento de doenças infecciosas, neoplasias e inflamações crônicas (FARIA et al., 2013).

Não observamos alterações na contagem total de leucócitos (WBC) e seus subtipos (linfócitos, segmentados, bastonetes, eosinófilos e monócitos) em animais ovariectomizados, porém, evidencia-se um efeito estimulador da terapia térmica sobre este parâmetro hematológico, ou seja, observou-se aumento na contagem de leucócitos totais, com característica de linfocitose no grupo OVX + TCT comparado

ao grupo C e TCT (tabela 2). Este resultado sugere uma ativação de sinalização imunológica por efeito da terapia de choque térmico em animais ovariectomizados, o que corrobora com outros estudos realizados por outros grupos, cujos resultados também mostram que, a hipertermia em tratamento repetitivo (terapia) produz aumento da concentração de leucócitos, especialmente do tipo linfócitos (TOMIYAMA et al., 2015). Essas alterações relacionadas ao sistema imunológico podem ter relação direta com os níveis de eHSP72 que possui atividade imunomoduladora (POCKLEY; MUTHANA, 2007; HECK et al., 2011).

Neste contexto, cabe abordar outro resultado deste trabalho, relacionado ao conteúdo de HSP70 extracelular circulante (eHSP70), considerando que o aumento da HSP extracelular envolve ações imunorregulatórias, pró-inflamatórias e sinalizadoras de dano ou risco de um provável dano celular (WILLIAMS; HUNTER-LAVIN, 2007). A terapia de choque térmico provocou um aumento na concentração plasmática de HSP70 em animais não ovariectomizados (TCT), comparado ao grupo de animais controle (C), o que não foi observado nos animais ovariectomizados (grupos OVX e OVX+TCT) (figura 5). Contudo, a grande variabilidade na concentração desta proteína nos animais do grupo OVX + TCT pode ter produzido interferência na análise comparativa entre os (grupos OVX e OVX+TCT) nesse parâmetro. Há que se considerar também a possibilidade de que, a diferença de resposta à terapia térmica, apresentada pelos grupos TCT e OVX+TCT (maior concentração de eHSP70 no grupo TCT e não observada no grupo OVX + TCT), possa indicar uma menor capacidade de resposta ao estresse (térmico e metabólico) nos animais ovariectomizados em razão da falta de estrogênio.

Analisou-se neste estudo parâmetros relativos ao estresse oxidativo e ao conteúdo de iHSP70 em tecidos direta ou indiretamente implicados no metabolismo, como o tecido adiposo, hepático, muscular e aórtico. Os resultados indicam que a resposta a ovariectomia (falta de estrogênio) e à terapia de choque térmico difere entre os tecidos analisados, tanto nos parâmetros de estresse oxidativo como no conteúdo celular de HSP72.

Em relação ao tecido aórtico, observamos que os animais submetidos a ovariectomia (OVX) apresentam conteúdo de HSP70 25% menor em relação ao

grupo controle ( $p=0,0821$ ), sugerindo uma menor capacidade de citoproteção neste tecido em razão da baixa concentração de estrogênio. Além disso, no grupo ovariectomizados e submetido a terapia de choque térmico (OVX + TCT) observa-se que a concentração desta proteína foi ainda menor, ou seja, 33% menor ( $p= 0,0277$ ) em relação ao grupo C (figura 6). Esta resposta do tecido aórtico a terapia de choque térmico sugere que a redução crônica na disponibilidade de estrogênio (13 semanas), influenciou negativamente a capacidade do tecido aórtico em responder a terapia de choque térmico/desafio térmico, considerando a reduzida expressão de HSP70 no referido grupo quando comparado ao grupo controle.

A resposta do tecido aórtico observada no nosso estudo difere de outra situação investigada em nosso grupo de pesquisa. O estudo, desenvolvido por Miragem e colaboradores (2015), foi realizado com ratas adultas (5 meses), ovariectomizadas e submetidas a uma única sessão de choque térmico, uma semana depois da ovariectomia. Neste foi observado que a resposta ao choque térmico se manteve preservada nos animais ovariectomizados, os quais apresentaram conteúdo de HSP70 cerca de 40% superior comparado as fêmeas apenas ovariectomizadas. Os autores do estudo sugerem que a falta de estrogênio por si só pode não ser a única razão para a baixa expressão de HSP70 observada em mulheres na pós-menopausa (MIRAGEM et al., 2015).

Os resultados relativos aos parâmetros de estresse oxidativo no tecido aórtico, analisados em condição de redução crônica na concentração de estrogênio, assemelham-se ao observado na condição de hipoestrogenismo de curto prazo (MIRAGEM et al., 2015), ou seja, no nosso estudo também não foram detectadas alterações nos níveis de lipoperoxidação. Contudo, observa-se redução da atividade antioxidante da enzima CAT (figura 7). No seu conjunto, os resultados deste estudo indicam que a redução crônica da disponibilidade de estrogênio está associada ao maior risco de desenvolvimento de processo inflamatório no tecido aórtico, seja pela maior concentração circulante de colesterol ou pela incapacidade de resposta tecidual ao estresse, marcada pela menor concentração de HSP70 e baixa atividade da enzima catalase. Neste contexto, a terapia de choque térmico pode exercer algum efeito protetor tendo em vista seu efeito benéfico sobre a concentração de HDL nos animais ovariectomizados (figura 4).

Quanto ao tecido hepático, não foi observada variação no conteúdo hepático de HSP70 entre os grupos experimentais (figura 8). Entretanto, os parâmetros de estresse oxidativo, indicam aumento da lipoperoxidação no grupo OVX e no grupo TCT, comparado ao grupo C (figura 9A). Quanto aos efeitos da terapia térmica sobre o tecido hepático, observa-se que ela produziu aumento da atividade antioxidante hepática exercida pela enzima SOD no grupo de animais ovariectomizados (figura 9C), em relação ao grupo controle (C), sugerindo a ativação do sistema antioxidante hepático, o que pode ter impedido a maior lipoperoxidação, como observado no grupo OVX (figura 9A). Os resultados relativos à avaliação de lesão hepatocelular, a partir da análise da atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanino aminotransferase (ALT), não mostram alterações hepáticas em nenhum dos grupos experimentais, visto que as referidas enzimas se encontram dentro dos padrões de normalidade em todos os grupos. Este dado é importante, pois indica certo grau de segurança para a realização deste protocolo experimental de terapia térmica.

Os resultados obtidos a partir da análise do tecido muscular (gastrocnêmio) indicam que neste se mantém inalterada a expressão de HSP70, independentemente da baixa disponibilidade de estrogênio e/ou da terapia de choque térmico (figura 10). Contudo, a terapia de choque térmico está associada a uma baixa concentração de MDA muscular, sugerindo efeito redutor da terapia de choque térmico sobre a lipoperoxidação muscular no grupo OVX + TCT, em comparação aos demais grupos experimentais (figura 11A), não obstante a redução na concentração da enzima superóxido dismutase (figura 11C) neste mesmo grupo, em comparação ao grupo TCT.

Como mencionado anteriormente, não detectamos alteração na concentração de HSP70 nos tecidos hepático e muscular em qualquer condição experimental. Neste contexto, entende-se importante analisar o contexto metodológico do nosso estudo. O conteúdo de HSP70 tecidual e plasmático foi analisado 48 horas após a última sessão de choque térmico (fator indutor da expressão de HSP70), a fim de que o efeito observado fosse, de fato, o efeito crônico, de várias sessões (terapia) de choque térmico. Tal conduta pode ter implicado nos resultados observados em relação ao conteúdo de HSP70, em especial, nos tecidos muscular e hepático,

considerando as diferenças teciduais e cronológicas na resposta ao estresse, após exposição à hipertermia e suas variações.

Sabe-se que o aquecimento agudo e crônico (terapia) induz uma variedade de alterações intracelulares, tais como alterações nucleares, em estruturas do citoesqueleto, no metabolismo celular, na síntese macromolecular e na transdução de sinais intracelulares. À nível transcricional, o choque térmico induz a expressão de genes de choque térmico, que codificam para a síntese de proteínas de choque térmico, como a HSP70. Esse processo ocorre via ativação dos fatores de transcrição para proteínas de choque térmico (HSF do inglês *heat shock fator*) e ligação em região específica do DNA conhecida como *Heat Shock Element* (HSE).

Diferentes estímulos têm repercussões de diferente magnitude e diferente temporalidade quanto a expressão de HSP70. Enquanto a translocação do HSF1 para o núcleo ocorre prontamente diante de desafios, aumento na expressão de mRNA de HSP70 pode ser observada já em minutos após situações de estresse (15 min-60min), enquanto que o aumento na concentração da proteína sintetizada pode ser detectável horas após (com pico em 4 horas após o desafio, por exemplo). A manutenção dos níveis elevados de HSP70 intracelulares (e extracelulares também) pode depender, portanto, do tipo e intensidade do desafio imposto ao organismo, assim como do tecido estudado (HECK, 2011). Além disso, a repetição de desafios pode gerar adaptações na síntese de HSP70, como em casos de termotolerância.

Células ou o corpo inteiro exposto à hipertermia adquirirão resistência transitória à uma ou mais exposições subsequentes a temperaturas elevadas, o que é denominado de termotolerância (HAHN; LI, 1990). O estabelecimento e o decaimento do estado de termotolerância tem sido correlacionado com mudanças no nível de proteínas de choque térmico, como HSP70, e o seu pico máximo tem sido mostrado como sendo em torno de 4-24 h após o aquecimento (LI; MIVECHIS; WEITZEL, 1995).

Por outro lado, os resultados observados, no presente estudo, em relação ao tecido adiposo, sugerem maior sensibilidade deste tecido a terapia de choque térmico. Diferentemente de outros tecidos analisados, neste se observa uma maior expressão de HSP70 no grupo de fêmeas ovariectomizadas quando estas são

submetidas a terapia térmica (OVX + TCT) (figura 12), comparado aos demais grupos experimentais. Este resultado evidencia uma resposta de defesa deste tecido metabólico, por meio do aumento da expressão de proteínas de choque térmico, HSP70. Ainda, sobre os parâmetros de estresse oxidativo, observa-se maior dano oxidativo nos animais ovariectomizados e submetidos a terapia térmica (grupo OVX+TCT) comparado ao grupo C. A redução crônica da disponibilidade de estrogênio influenciou o equilíbrio redox neste tecido, o que pode ser evidenciado pela baixa atividade da enzima catalase nos grupos OVX e OVX+TCT (figura 13).

Há que se considerar que, na condição de hipoestrogenismo e alterações metabólicas lipídicas decorrentes, o tecido adiposo apresenta maior fragilidade, dentre os tecidos analisados. O aumento da expressão de HSP70, neste caso, pode representar uma resposta tecidual anti-inflamatória importante. O estresse tecidual induzido por calor, estimula a expressão de HSP72, cujos efeitos intracelulares conferem citoproteção contra estresse proteotóxico. As ações anti-inflamatórias da HSP70 residem, especialmente, no seu efeito inibitório sobre a ativação e translocação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (ASEA; DE MAIO, 2007). Esta ação tem implicação no sistema imunológico, em processos inflamatórios e em fatores reguladores da sobrevivência celular e do apoptose (RAN et al., 2004).

Neste estudo analisou-se também o índice da razão entre os conteúdos de HSP70 extracelular/intracelular (índice H), descrito como índice geral do estado imunoinflamatório de um indivíduo (GOETTEMS-FIORIN et al., 2016). Esta proposição fundamenta-se no fato de que uma maior concentração de HSP70 no ambiente extracelular (eHSP70) associa-se a prevalência de sinais pró-inflamatórios. Por outro lado, para cada situação em particular, quanto mais células são capazes de responder a estímulos de estresse, elevando o conteúdo intracelular de HSP70 (iHSP70), mais células contribuirão a prevalência de uma condição geral anti-inflamatória (KRAUSE et al., 2015a; HECK; SCHOLER; DE BITTENCOURT, 2011). O índice H foi calculado e analisado para cada tecido em particular, comparando cada condição experimental (grupos experimentais) com uma condição controle (grupo C). Os resultados obtidos neste estudo, mostram valores médios de índice H próximos à 01 (um) (figura 14), o que sugere uma condição de equilíbrio quanto a

este biomarcador de status inflamatório. Contudo, não são suficientemente contundentes para concluir acerca do perfil inflamatório nos animais deste estudo, podendo ser complementado pela análise de citocinas plasmáticas.

Apesar de não ter sido observado um desbalanço na homeostase glicêmica, os desajustes no perfil lipídico (aumento da colesterolemia e da fração LDL) e no peso ponderal, causados pela ovariectomia, podem estar associados com o desenvolvimento de doença inflamatória crônica metabólica. A inflamação crônica de baixo grau é um processo subclínico, sem resolução e normalmente estabelecido, em primeiro lugar, em adipócitos. A inflamação, por sua vez, resulta na secreção de citocinas inflamatórias a partir de macrófagos e / ou adipócitos, o que resulta na ativação de quinases como JNK e o inibidor IKK, em tecidos o tecido adiposo, músculo esquelético e o fígado (NEWSHOLME; DE BITTENCOURT, 2014).

Dados relativos a estudos que apontam os “prós e contras” acerca do uso de terapia térmica, foram analisados e apresentados em artigo recentemente publicado (KRAUSE et al., 2015b). De um modo geral, a terapia térmica tem sido fortemente indicada para indivíduos com resistência insulínica, porém, há precauções para gestantes e contraindicação para indivíduos com alterações cardiovasculares. Com base neste estudo, com fêmeas ovariectomizadas, demonstramos que a terapia térmica não modificou um grande contingente de variáveis como hematológicas e de função orgânica (hepática) e apresenta benefícios sobre o controle do peso ponderal, no aumento da fração HDL e na citoproteção no tecido adiposo, corroborando com os “prós” já mencionados no artigo citado. Contudo, outros estudos são necessários para elucidação dos mecanismos envolvidos nos efeitos da terapia de choque térmico, em animais ovariectomizados e/ou mulheres em pós-menopausa, especialmente sobre o metabolismo de triglicerídeos e na homeostase vascular e metabólica.

## 7 CONCLUSÃO

- ⇒ A ovariectomia causou maior ganho ponderal e hipercolesterolemia, porém não influenciou o consumo calórico e a homeostase glicêmica.
- ⇒ A terapia de choque térmico preveniu o aumento de peso corporal e causou elevação da fração HDL colesterol, porém acentuou a trigliceridemia em animais ovariectomizados.
- ⇒ A terapia de choque térmico elevou a concentração de eHSP70 apenas em animais com ovários intactos (grupo TCT), sugerindo alteração na resposta ao estresse nos organismos com baixa disponibilidade de estrogênio.
- ⇒ O perfil hematológico de animais ovariectomizados mostra maior concentração de leucócitos, com perfil de linfocitose, após terapia de choque térmico, sugerindo ativação do sistema de defesa leucocitário.
- ⇒ Os efeitos da ovariectomia e da respectiva terapia de choque térmico diferem em relação ao tecido analisado:
  - A resposta do tecido aórtico à terapia de choque térmico revela reduzida capacidade de resposta ao estresse associada a condição de redução crônica de estrogênio circulante;
  - No tecido hepático, a ovariectomia causa maior lipoperoxidação. A resposta a terapia de choque térmico revela aumento da atividade antioxidante da enzima SOD nos animais ovariectomizados. A atividade das enzimas ALT e AST revelam atividade hepática normal em todas as condições experimentais.
  - O tecido muscular (gastrocnêmio) não apresenta alteração em resposta a ovariectomia, porém, a terapia de choque térmico está associada com uma redução do dano oxidativo e com aumento da defesa antioxidante da SOD nos animais ovariectomizados, revelando maior capacidade de defesa e adaptação ao estresse neste tecido.

- A resposta do tecido adiposo à ovariectomia revela menor atividade antioxidante da enzima catalase, predispondo-o a peroxidação lipídica. A resposta à terapia de choque térmico nos animais ovariectomizados evidencia ativação da resposta de defesa, por meio do aumento da expressão de iHSP70, indicando possível efeito protetor da terapia sobre este tecido.
- ⇒ Os valores relativos ao índice H, considerando os tecidos analisados e as condições experimentais, não diferem em razão da ovariectomia e/ou da terapia de choque térmico.

## **8 Considerações finais, limitações do estudo e perspectivas futuras.**

Apesar das evidências acerca dos benefícios da terapia de choque térmico sobre diversos parâmetros avaliados, especialmente sobre o controle de peso, o aumento da fração HDL e a citoproteção no tecido adiposo, em animais ovariectomizados, outros estudos são necessários para elucidação dos mecanismos envolvidos no efeito da terapia de choque térmico sobre a metabolismo, especialmente dos triglicerídeos, e respectivas implicações na homeostase vascular e metabólica.

A indução de proteínas de choque térmico, por meio da terapia de choque térmico, por conseguinte, pode apresentar benefícios terapêuticos e pode representar um importante mecanismo de citoproteção e de resolução do processo inflamatório, contribuindo para a redução do risco de doença metabólica inflamatória, especialmente em organismos mais susceptíveis, como organismos com baixa concentração de estrogênio.

O estudo em questão traz algumas limitações como o uso de anestesia e a não realização de algumas dosagens, como Interleucinas, TNF $\alpha$  e Proteína C Reativa devido a quantidade de amostra de sangue dada pelo modelo animal não ser suficiente .

Mais estudos são necessários com o objetivo de aprofundar os aspectos de segurança do uso da terapia térmica, como terapêutica em mulheres na pós menopausa.

## 9 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** p. 105-121, 1994.
- AHN, Sang-Gun; THIELE, Dennis J. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. **Genes & Development**, v.17, p. 516–528, 2003.
- ANCKAR, J.; SISTONEN, L. Regulation of HSF1 Function in the heat Stress Response: Implications in Aging and Disease. **Annual Rev. Biochem**, p.1089-1115, 2011.
- ASEA, A. A. A.; DE MAIO, A. A história por dentro: funções anti-inflamatória do HSF1 e das proteínas de choque térmico. In: Alexander A. A. Asea and Antonio De Maio, Protein Reviews, Volume 1: **Heat Shock Proteins: Potent mediators of inflammation and immunity** - Edited, v.1, cap.7, Ed. Springer, 2007.
- ASEA, A. Heat shock proteins and toll-like receptors. **Handb Exp Pharmacol.**, n. 183, p. 111-27, 2008.
- ATALAY, M; OKSALA, N; LAPPALAINEN, J; LAAKSONEN, D. E; SEN, C. K; ROY, S. Heat shock proteins in diabetes and wound healing. **Curr Protein Pept Sci**, v. 10, n. 1, p. 85-95, feb. 2009.
- BALTHAZART, J; BALL, G.F. Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? **Trends in Neurosciences**, n. 29, p. 241–249, 2006.
- BARBOSA, K.B.F; et al. Estresse Oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.
- BATHAIE, S.Z; JAFARNEJAD, A.; HOSSEINKHANI, S.; NAKHJAVANI, M. The effect of hot-tub therapy on serum Hsp70 level and its benefit on diabetic rats: A preliminary report. **Int. J. Hyperthermia**, v. 26, n.6, p. 577-585, 2010.
- BETSY, L, et al. Association of Oxidative Stress, Iron, and Centralized Fat Mass in Healthy Postmenopausal. **Women Journal of Women's Health**. v. 18, n. 6, p. 795-801. 2009.
- BOCK, P. M; KRAUSE, M K; SCHOEREDER, H T;HAHN, G F; TAKAHASHI, H K.; SCHOLER, C M. NICOLLETI, G.;NETO, L D N.; RODRIGUES, M I L.; BRUXEL M A.; BITTENCOURT JR. PIH. Oral supplementations with L-glutamine or L-alanyl-L-glutamine do not change metabolic alterations induced by long-term high-fat diet in the B6.129F2/J mouse model of insulin resistance, **Mol Cell Biochem**, 2015.

BOTTNER, M; CHRISTOFFEL, J; WUTTKE, W. Effects of long-term treatment with 8-prenylnaringenin and oral estradiol on the GH-IGF-1 axis and lipid metabolism in rats. **J Endocrinol**, v. 198, n. 2, p. 395-401, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-54, may., 1976.

BRASIL. 2011. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Primeiros resultados definitivos do Censo 2010: população do Brasil*. Acesso em 19 de fevereiro de 2015: [www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia).

BRINTON, R.D.. The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. **Trends in Neurosciences**, p. 529 – 537, 2008.

BROWN, E. T; UMINO, Y; LOI, T; SOLESSIO, E; BARLOW R. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. **Visual Neuroscience**, v. 22, p. 615 – 618, 2005.

BUEGE, J.A; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v.52, p. 302-309, 1978.

CALDERWOOD, S. K; MAMBULA, S. S; GRAY, P. J; THERIAULT, J. R. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. **Cellular Stress**, v. 581, n. 19, p. 3689-3694, july. 2007.

CAMPOREZ, J. P. G; JORNAYVAZ, F. R; LEE, H, Y; SHOICHI, K; GUIGNI, B. A; KAHN, M.; SAMUEL, V. T.; CARVALHO, C. R.O.; PETERSEN, K. F.; JURCZACK, M. J; SHULMAN, G. I. Cellular Mechanism by Which Estradiol Protects Female Ovariectomized Mice From High-Fat Diet-Induced Hepatic and Muscle Insulin Resistance. **Endocrinology**, v. 154, n. 3, p.1021-1028, mar. 2013.

CARR, M. The Emergence of the Metabolic Syndrome with Menopause. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 6, p. 2404-2411, 2003.

CHEN, H.W; KUO, H.T; WANG, S.J; LU, T.S; YANG, R.C. In vivo heat shock protein assembles with septic liver NFκB/IκB complex regulating NFκB activity. **Shock**, v. 24, n. 3, p. 232-238, 2005.

CHEN, Z; BASSFORD, T; GREEN, S.B; CAULEY, J.A; JACKSON, R.D. Postmenopausal hormone therapy and body composition, a substudy of the estrogen plus progestin trial of the Women's Health Initiative. **Am J Clin Nutr** , v. 8s, n.3, p. 651-656, 2005.

CHUNG, J; NGUYEN, A. K; HENSTRIDGE, D. C; HOLMES, A. G; CHAN, M. H; MESA, J. L; LANCASTER, GI; SOUTHGATE, R. J; BRUCE, C. R; DUFFY, S. J; HORYATH, I; MESTRIL, R; WATT, M. J; HOOPER, P. L; KINGWELL, B. A; VIGH, L;

HEVENER, A; FEBBRAIO, M. A. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, n.5, p. 1739-1744, 2008.

CLEGG, D.J; BROWN, L. M; WOODS, S. C; BENOIT, S. C. Gonadal Hormones Determine Sensitivity to Central Leptin and Insulin. **Diabetes**, v. 55, p. 978-987, 2003.

COOKE, P. S.; NAAZ, A. Role of estrogens in adipocyte development and function. **Biol Med.**, Maywood, v. 229, p. 1127-1135, 2004.

CUI, Yanjun; HAO, Yue; LI, Jielei; BAO, Weiguang; LI, Gan; GAO, Yanli; GU, Xianhong. Chronic Heat Stress Induces Immune Response, Oxidative Stress Response, and Apoptosis of Finishing Pig Liver: A Proteomic Approach. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 393, 2016.

DE MAIO, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: A form of communication during injury, infection, and cell damage It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. **Cell Stress and Chaperones**, v. 16, p. 235–249, 2011.

DOSHI, S. B.; AGARWAL, A. The role of oxidative stress in menopause. **Journal of Mid-life health**, v. 4, n. 3, Jul-Sep 2013.

ESCALANTE-GÓMEZ, C; QUESADA-MORA, S; ZÉLEDON-SANCHEZ, F. Perfil oxidativo de la mujer menopausica: Papel de los estrógenos en lá prevencion y tratamiento de las enfermedades. **Acta medica Costarricense**, n.4, v.51, 2009.

FARIA, M. A; SIMÕES, R. S; SANTOS, M. A; JUNIOR, J. M. S; CARBONE, A. A. F. Post-menopause and immune system. **Reprod Clim**, v. 28, n.2, p 30-5, 2013.

FAVARATO, M. E. C. S; ALDRIGHI, J. M. A Mulher Coronariopata no climatério após a menopausa: implicações na qualidade de vida. **Rev. Ass. Med**, v. 47, n.4, p. 339-345, 2001.

FEIGE, U; MORIMOTO, R. I; YAHARA, I; POLLA, B. S. **Stress-Inducible Cellular Responses**, 1996.

FRIEDEWALD, W.J; LEVY. R.J; FREDRIKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem.**, v. 18, n.6, p. 499-502, 1972.

GASPARD, U. J; GOTTAL, J. M; VAN DEN BRULE, F. A. Postmenopausal changes of lipid and glucose metabolism: a review of their main aspects. **Maturitas**, v. 21, p.171-178, 1995.

GEIGER, P. C; GUPTA, A. A. The Role of Estrogens in the Regulation of Peripheral Glucose Dynamics. **Integrative Biology of Women's Health**, p. 67-86, 2013.

GOETTEMES-FIORIN, P.B. Exposição crônica à MP2,5 agrava disfunção metabólica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos, **Dissertação de Mestrado** - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2014.

GOETTEMES-FIORIN, Pauline Brendler; GROCHANKE, Bethânia Salamoni; BALDISSERA, Fernanda Giesel; DOS SANTOS, Analu Bender dos Santos; HOMEM DE BITTENCOURT JR, Paulo Ivo Homem; LUDWIG, Mirna Stela; RHODEN, Claudia Ramos; HECK, Thiago Gomes. Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development in high-fat diet-treated mice: stress response and extracellular to intracellular HSP70 ratio analysis. **J Physiol Biochem**, 2016.

GROSSMAN, C. J; ROSSELLE, G. A; MENDENHALL, C. L. Sex steroid regulation of autoimmunity. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 4-6, p. 649-659, 1991.

GRUNWALD M. S; PIRES, A. S; ZANOTTO, A; GASPAROTTO, J; GELAIN, D. P; DEMARTINI, D. R; SCHOLER, C. M; BITTENCOURT, P. I. H; MOREIRA, J. C. F. The oxidation of HSP70 is associated with functional impairment and lack of stimulatory capacity. **Cell Stress and Chaperones**, 2014.

GUERRA, Rebeca Cambray; ZUÑIGA-UMÑOZ, Alejandra; LANS, Verónica Guarner; DÍAZ-DÍAZ, Eulises; BETANCOURT, Carlos Alberto Tena; PÉREZ-TORRES, Israel. Modulation of the Activities of Catalase, Cu-Zn, Mn Superoxide Dismutase, and Glutathione Peroxidase in Adipocyte from Ovariectomised Female Rats with Metabolic Syndrome. **International Journal of Endocrinology**, Hindawi, v. 2014, 2014.

GUPTA, A. A; BOMHOFF, G. L; SWERDLOW, R. H; GEIGER, P. C. Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. **Diabetes**, v. 58, n. 3, p. 567-578, mar. 2009.

GUYTON, A.C & HALL, J.E. **Lipid Metabolism**. Textbook of Medical Physiology, 13<sup>a</sup> ed., 2015..

HAGEMAN, J; VAN WAARDE, M. A; ZILICKS, A; WALERICH, D; KAMPINGA, H. H. The diverse members of the mammalian HSP70 machine show distinct chaperone-like activities. **Biochem J**, v.435, n.1, p.127-142. 2011.

HAHN, G.M; LI, G.C Thermotolerance, Thermoresistance and Thermosensitization, pg79-100 In: MORIMOTO, R. **Stress Proteins in Biology and Medicine**, CSH, 1990.

HAMILTON, K. L; MBAI, F. N; GUPTA, S; KNOWLTON, A.A. Estrogen, Heat Shock Proteins, and NF\_ B in Human Vascular Endothelium. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, p. 1628-1633, 2004.

HECK, T. G. Razão entre o conteúdo extracelular e intracelular de hsp70 como um sinal de alerta imunológico e marcador de intensidade de exercício. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

HECK, T. G; SCHOLER, C. M; DE BITTENCOURT, P. I. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? **Cell Biochem Funct**, v. 29, n. 3, p. 215-226, apr. 2011.

HEINE P. A; TAYLOR J. A; IWAMOTO G. A; LUBAHN, COOKE PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-α knockout mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, p. 12729-34, 2000.

HENDERSON, V. W. Action of estrogens in aging brain: dementia and cognitive aging. **Biochem Biophys Acta**, n. 10, p. 1077-1083, 2010.

HIGHTOWER, L. E.; P. T. GUIDON JR. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. **J Cell Physiol**, v.138, n.1, p.257–266, 1989.

HOFF, C. Sounding board. Immoral and moral uses of animals. **N Engl J Med**, v. 302, n.2, p. 115-118, 1980.

HÖHN, A; KÖNIG, J; GRUNE, T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. **Journal of Proteomics**, v. 92, p. 132-159, 2013.

HOOPER, P. L. Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v.341, n.12, p.924-925, sept. 1999.

HOOPER, P.L; BALOGH,G.; RIVAS, E; KAVANAGH, K; LASZLO, V. The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes, **Cell Stress and Chaperones**, 19:447–464, 2014.

HOU, Y; WEI, H; LUO, Y; LIU, G. Modulating expression of brain heat shock proteins by estrogen in ovariectomized mice model of aging, **Experimental Gerontology**, 45, p. 323-330, 2010.

HSIEH, Y. D; DEVLIN, H; MCCORD, F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. **Arch Oral Biol**, v. 40, n.6, p. 529-31, 1995.

HUNTER, M. S. Emotional well-being, sexual behaviour and hormone replacement therapy. **Maturitas**, v. 12, p. 299-314, 1990.

JACKSON, K. C; WOHLERS, L. M; LOVERING, R. M; SCHUH, R. A; MAHER, A. C; BONEN, A; KOVES, T. R; ILKAYEVA, O; THOMSON, D. M; MUOIO, D. M; SPANGENBURG, E. E. Ectopic lipid deposition and the metabolic profile of skeletal muscle in ovariectomized mice. **Am J Regul Comp Physiol**, v. 304, p. 206=217, 2013.

JENSEN, J; NILAS, J; CHRISTIANSEN, C. Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. **Maturitas**, v. 12, n.4, p. 321-331, 1990.

KALMAR, B; GREENSMITH, L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 61, n. 4, p. 310-318, apr. 2009.

KAMPINGA, H.H; HAGEMAN, J; VOS, M. J; KUBOTA, H; TANGUAY, R. M; BRUFORD, E.A; CHEETHAM, M.E; CHEN, B; HIGHTOER, E. Guidelines for nomenclatures of the human heat shock proteins. **Cell Stress and Chaperones**, v. 14, p. 105-111, 2009.

KANE, J.P; MALLOY, M.J., Disorders of lipoprotein metabolism. In: GREENSPAN, F.S. & BAXTER, J.D. **Basic & Clinical Endocrinology**, 4 ed., Prentice-Hall International Inc., 1994.

KELLE, E. T; ZHANG, J; YAO, Z. Y. The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of menopause. **J Reprod Immunol**, v. 50, N. 1, P. 41-55, 2001.

KIANG, J. G; TSOKOS, G.C. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. **Pharmacol. Ther.**, v. 80, n. 2, p. 183–201, 1998.

KIM, J.H; CHO, H. T; KIM, Y. J. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. **Endocrine Journal**, v. 61, n. 11, p. 1055-1067, 2014.

KNOWLTON, A. A; SUN, L. Heat shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat shock protein expression in the heart. **Am J Physiol**, v. 280, p. H455–H464, 2001.

KRAUSE, M; BOCK PM; TAKAHASHI HK; HOMEM DE BITTENCOURT PI Jr; NEWSHOLME P. The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes. **Clin Sci (Lond)**, v. 128, p. 789-803 2015.

KRAUSE, M; HECK, T. G; BITTENCOURT, A; SCOMAZZON, S. P; NEWSHOLME, P; CURI, R; BITTENCOURT, P. I. H. The chaperone balance hypothesis: The importance of the Extracellular to Intracellular HSP70 Ratio (eHSP70/iHSP70) to inflammation-driven Type 2 Diabetes, the effect of exercise and the implications for clinical management, **Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation**, feb. 2015a.

KRAUSE, M.; LUDWIG, M. S.; HECK, T. G.; TAKAHASHI, K. Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 18, n.04, july. 2015b.

KRAUSE, M.S; OLIVEIRA Jr. L.P; SILVEIRA, E.M; VIANNA, D.R; ROSSATO, J.S; ALMEIDA, B.S. MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells? **Cell Biochem Funct**, v. 25, p. 23-32, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.259, p.680-685, 1970.

LEE, C. E; MACARDLE, A; GRIFFITHS, R. D. The role of hormones, cytokines and heat shock proteins during age-related muscle loss. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 5, p. 524-534, october. 2007.

LEVIN, E. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. **Steroids**, v.67, p. 471–475, 2002.

LI, G. C; MIVECHI, NF, WEITZEL G. Heat shock proteins, thermotolerance, and their relevance to clinical hyperthermia. **Int J Hyperthermia**. Jul-Aug, v.11, n. 4, p. 459-88, 1995.

LIU, Y; DING,U; BUSH, T. L; LONGENECKER, J. C; NIETO, F. J; GOLDEN, S. H; SZKLO, M. Relative androgen excess and increased cardiovascular risk after menopause: a hypothesized relation. **Am J Epidemiol**, v. 154, n. 6, p 489-494, 2001.

LORENZI, D. R. S; CATANI, L. B; MOREIRALL, K; ARTICOL, G. R. Assistência à mulher climatérica: novos paradigmas. **Rev Bras Enferm**, v. 62, n. 2, p.287-293, Brasília, mar-abril. 2009.

LUDWIG, M.S. Proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) ligam-se à insulina na circulação sanguínea modulando a disponibilidade de glicose circulante. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

MANTHEY, D; BEHL, C. From structural biochemistry to expression profiling: Neuroprotective activities of estrogen, **Neuroscience**, v. 138, n. 3, p. 845-850, 2006.

MARKLUND, S; MARKLUNG, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, v. 47, p. 469-474, 1974.

MEDEIROS, S. F; OLIEVIRA, V. N; YAMAMOTO, M. M. W. Epidemiologia clínica do climatério. **Reprod Clim**, V. 18, N. 1, P. 79-86, 2003.

MEYER M.R; FREDETTE, N.C; HOWARD, T.A; HU, C; RAMESH, C. DANIEL, C; AMANN, K; ARTERBURN, J.B; BARTON, M; PROSSNITZ, E.R; G protein-coupled estrogen receptor protects from atherosclerosis. **Sci Rep.**, v. 23, n.4, 2014.

MEYER, T. N. Resposta celular ao estresse. **Rev Ass Med Brasil** v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.

MIRAGEM, A. A; LUDWIG, M. S; HECK, T. G; BALDISSERA, F. G; SANTOS, A. B; FRIZZO, M. N; BITTENCOURT Jr. P. I. H. estrogen deprivation does not affect vascular heat shock response in female rats: a comparison with oxidative stress markers. **Mol Cell Biochem**, Jun 2015.

NAHAS, E. A. P; NAHAS-NETO, J; ORSATTI, C. L; SOBREIRA, M. L; TARDIVO, A. P; WITKIN, S. S. Evaluation of clinical and inflammatory markers of subclinical carotid atherosclerosis in postmenopausal women, **Menopause**, v. 21, n. 9, p. 982-989, sep 2014.

NELSON, H. D. Menopause, **Lancet**, v. 1, n. 371, p. 760-770, mar. 2008.

NEWSHOLME, P; DE BITTENCOURT, P. I. H. Jr. The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 2014.

NEWSHOLME, P; GAUDEL, C; KRAUSE, M. Mitochondria and Diabetes. An Intriguing Pathogenetic Role. **Advances in Experimental Medicine**, v. 942, p.235-247, 2012.

OLSN, N. J; KOWACKS, W. J. Gonadal steroids and immunity, **Rev. Endocr.** v. 19, n. 4, p. 369-384, 1996.

PAROO, Z; DIPCHAND, E.S; NOBLE, E.G. Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 282, n. 2, p. 245-251, 2002.

PELLEGRINI, M; BULZOMI, P; GALUZZO, P; LECIS, M; LEONE, S; PALLOTTINI, V; MARINO, P. Naringenin modulates skeletal muscle differentiation via estrogen receptor a and b signal pathway regulation. **Genes Nutr**, v.9, 2014.

POCKLEY, A. G., J. SHEPHERD, CORTON, J. M. Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. **Immunol Invest**, v.27, n.1, p.367-377. 1998.

POCKLEY, G; MUTHANA, M. Immunoregulatory activities of extracellular Stress Proteins. In: CALDERWOOD, S.K. **Cell Stress Proteins**, volume 7, Springer, 2007

QU, H; DONKIN, S. S; AJUWON, K. M. Ajuwon .Heat stress enhances adipogenic differentiation of subcutaneous fat depot–derived porcine stromovascular cells. **J Anim Sci.**, v. 93, n. 8, p. 3832-3842, aug. 2015.

RAN, R., A. LU. Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. **Genes Dev**, v.18, n.12, p.1466-1481, jun. 2004.

RETTBERG, J. R; JIA, Y; BRINTON, R. D. Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, p. 8- 30, 2014.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. 18, p. 571-573, 1962.

SAHA, J.K; XIA, J; GRONDIN, J. M; ENGLE, S. K; JAKUBOWISKI, J. A. Acute Hyperglycemia Induced by Ketamine/Xylazine Anesthesia in Rats: Mechanisms and Implications for Preclinical Models. **Exp Biol Med**, v. 230, p. 777– 784, 2005.

SANTORO M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochem Pharmacol**, v. 59, p. 55-53, 2000.

SANTOS, R.D.S; CARVALHO, F.G.D.; LIMA, T. P et al. Perfil do Estado de Saúde de Mulheres Climatéricas. **Medicina**, Ribeirão Preto, 2012.

SHOENACKER, D. A; JACKSON, C. A; ROWLANDS, J. V; MISHRA, G. D. Socioeconomic position, lifestyle factor and age at natural menopause: a systematic review and meta-analyses of studies across six continents. **Int J Epidemiol**, v.43, n.5, p. 1542-1562, 2014.

SIBONGA, J. D; LOTINUM. S; EVANS, G. L; PRIBLUDA, V. S; GREEN, S. J; TURNER, R. T. Dose-response effects of 2-methoxyestradiol on estrogen target tissues in the ovariectomized rat. **Endocrinology**, v. 144, n.3, p. 785-792, 2003.

SINGH, I. S; HASDAY, J. D. Fever, hyperthermia and the heat shock response. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 5, p. 423-435, 2013.

SLUIJMER, A. V; HEINEMAN, M. J; KOUDSTAAL, J; THEUNISSEN, P. H; DE JONG, F.H; EVERS, J.L. Relationship between ovarian production of estrone, estradiol, testosterone, and androstenedione and the ovarian degree of stromal hyperplasia in postmenopausal women. **Menopause**, v. 5, p. 207-210, 1998.

SOBRINO, A; OVIEDO, P. J; NOVELLA, S; LAGUNA-FERNANDEZ, A; BUENO, C; GARCIA-PEREZ, M. A; TARIN, J. J; CANO, A; HERMENEGILDO, C. Estradiol

selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor. **Journal. Mol. Endocrinol**, v. 44, p. 237-246, 2010.

SPANGENBURG, E. E; JACKSON, K. C. The Contribution of Ovarian Hormones to the Cellular Regulation of Lipid Metabolism. **Integrative Biology of Women's Health**, p. 53-66, sep. 2013.

STEVENSON, J.C ; CROO, K D; GODSLAND, I.F. Influence of age and menopause on serum lipids and lipoproteins in healthy women. **Atherosclerosis**, v. 98, p. 83-90. 1993.

STUBBINS, R. E; NAJJAR, K; HOLCOMB, V. B; HONG, J; NUNES, N.P. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 14, n.1, p. 58-66, jan. 2012.

SUBBIAH, M. T; KESSEL, B; AGRAWAL, M; RAJAN, R; ABPLANALP W.; RYMASZEWSKI, Z. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. **J Clin Endocrinol Metab**. V. 77, n. 4, p. 1095-7, oct. 1993.

SUN, J; CHANG, S.R; KIRCHHOFF R; KNOWLTON, A.A. Activation of HSF and selective increase in heat-shock proteins by acute dexamethasone treatment. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 278, p. 1091-1097, 2000.

TAKAYAMA, S; REED, J. C; HOMMA, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. **Oncogene**, v. 22, p. 9041–9047, 2003.

TOMIYAMA, Chikako; WATANABE, Mayumi; HONMA, Takashi; INADA, Akihiro ; HAYAKAWA, Takayoshi; RYUFUKU, Masae; ABO, Toru . The effect of repetitive mild hyperthermia on body temperature, the autonomic nervous system, and innate and adaptive immunity. **Biomedical Research**, v. 36, n.2, p. 135-142, Tokyo, 2015.

USA-FAO – Food and Agriculture Organization. Carbohydrates is Human Nutrition. 1997. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/w8079e/w8079e00.htm#Contents>.

VAN DE VELDE, S; ST PIERRE, I. A; BYRD, B. R; FARGO, J. S; LORING, L. DALLECK, L. C. Effects of Exercise Training with a Sauna Suit on Cardiovascular Health: a Proof-of-Concept Study. **Int J Res Ex Phys.**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2016.

VOSS, M. R.; STALLONE, J. N.; MIN LI, R. N. M.; COMELUSSEN, P.; KNUEFERMANN, A. A. Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen, **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 2, p. 687-692, august. 2003.

VOSS, P; SIEMS, W. Clinical oxidation parameters of aging. **Free Radical Research**, v. 40, n. 12, p. 1339–1349, December 2006.

WHO **Scientific Group on Research on the Menopause** in the 1990s. Geneva, WHO technical report series; 866,1-107, 1996.

WILLIAMS, J. H. H; HUNTER-LAVIN, C; IRELAND, H. E; LEONI, F; ALTAIE, O; BIRCH, C. S; COLEMAN, R. C. Measuring the secretion of heat shock proteins from cells. **Methods**, v. 43, n. 3, p. 176-183, nov. 2007.

YANG, Y.L; LU, K.T; TSAY, H.J; LIN, C.H; LIN, M.T. Heat shock protein expression protects against death following exposure to heatstroke in rats. **Neuroscience Letters**, v. 252, p. 9-12, 1998.

ZHU, B. T ; CONNEY, A. H. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 1, p..1–27, 1998.

## 10 ANEXOS

### 10.1 ANEXO A – Parecer CEUA



#### Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIJUI

#### **PARECER CONSUBSTANCIADO Nº. 003/2015**

Protocolo de Pesquisa nº. 003/2015 de 13/02/2015.

Projeto: "EFEITO DA TERAPIA DE CHOQUE TÉRMICO SOBRE O METABOLISMO GLICÍDICO E LIPÍDICO, ESTADO REDOX E INFLAMATÓRIO EM RATAS OVARECTOMIZADAS"

Finalidade: Pesquisa

Duração: Início: Março de 2015 - Término: Janeiro de 2016

Pesquisador Responsável: Profª Mirna Stela Ludwig

Colaboradores: Thiago Gomes Heck; Yana Picinin Sandri; Carolain Felipin Vincenzi; Analu Bender dos Santos; Matias Nunes Frizzo; Pauline Brendler Goettens Fiorin.

Área do conhecimento: Ciências Biológicas: Fisiologia

Cronograma de utilização de Animais:

Data: 2015/2016

Espécie: Rato isogênico

Sexo: Fêmea

Quantidade: 32

Avaliação do Protocolo de Pesquisa, segundo orientações da Lei Nº 11.794 de outubro de 2008.

#### PARECER DA COMISSÃO

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como APROVADO, conforme ata da reunião realizada em 27/02/2015. O mesmo atende aos Requisitos Fundamentais das Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da UNIJUI,

assim como as responsabilidades do pessoal envolvido no uso de animais da Resolução Normativa Nº01 do CONCEA, de 09 de julho de 2010.

Solicita-se ao (à) pesquisador (a) o envio a esta CEUA, de relatórios parciais sempre quando houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final.

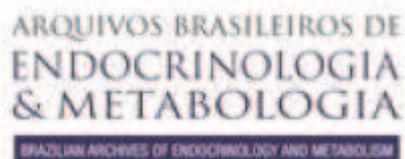
Ijuí, 27 de fevereiro de 2015.



Prof. Fernando Silvério Ferreira da Cruz  
Coordenador da CEUA/UNIJUI

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIJUI  
Telefone: (55) 3332-0301  
E-mail: ceua@unijui.edu.br  
Rua do Comércio, 3000, Bairro Universitário, Ijuí/RS - Brasil CEP 98700-000.

## 10.2 ANEXO B – Normas da revista



ISSN 00042730 - *print version*

ISSN 16779487 - *online version*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

General Information

Manuscript Categories

Manuscript Preparation

For Papers Submitted In English

General Information

We emphasize the importance of following these instructions carefully.

Failure to do so will delay the processing of your manuscript.

Manuscripts should be submitted solely to ABE&M and may not have been published, or be under consideration for publication, in any substantial form in another periodical—professional or lay.

Manuscripts must be written in idiomatic English or Portuguese and conform to the specifications described below. If authors are not fluent in written medical and scientific English, they are strongly encouraged to have their manuscripts reviewed and edited by an expert English writer prior to submission. This will increase the chances that the

paper will be accepted and will speed the publication of those manuscripts that are accepted.

Papers that do not meet these requirements will be returned to the author for necessary revision before formal review.

All submissions are initially evaluated in depth by the scientific editors.

Papers that do not conform to the general criteria for publication will be returned to the authors without detailed review, typically within three to five days. Otherwise, manuscripts will be sent to reviewers (most commonly two).

Manuscript Categories

Reports of original research may be submitted to ABE&M as an Original Article or Brief Report. Other special categories of manuscripts are described below. All manuscripts must adhere to the word count limitations, as specified below, for text only; the word count does not include the abstract, references, or figure/table legends. The word count must be noted on the title page, along with the number of figures and tables. The format is similar for all manuscript categories and it is described in detail in “Manuscript Preparation” section.

### ORIGINAL ARTICLES

Original Article is a scientific report of the results of original research that has not been published or submitted for publication elsewhere (either in print or electronically). Represent a substantial body of laboratory or clinical work. In general,

original paper should not exceed 3600 words in the main text, include no more than six figures and tables and 35 references.

#### REVIEW ARTICLES

The ABE&M publishes review articles which present a balanced perspective on timely issues within the field of clinical endocrinology. All reviews are submitted upon invitation and are subject to peer review. Articles in this category are requested by the Editors to authors with proven experience in the field. Authors considering the submission of uninvited reviews should contact the editors in advance to determine whether the topic that they propose is of current potential interest to the Journal.

These manuscripts should be no longer than 4000 words in the main text, include no more than four figures and tables and 60 references.

The author should mention the source and/or request authorization for use of previously published figures or tables.

#### CONSENSUS STATEMENTS

Consensus Statements related to the endocrine and metabolic health standards and healthcare practices may be submitted by professional societies, task forces, and other consortia. All such submissions will be subjected to peer review, must be modifiable in

response to criticisms, and will be published only if they meet the Journal's usual editorial standards. These manuscripts should typically be no longer than 3600 words in the main text, include no more than six figures and tables and 60 references.

#### BRIEF REPORT

Brief report should consist of new data of sufficient importance to warrant immediate publication. It is a succinct description of focused study with important, but very straightforward, negative or confirmatory results. Brevity and clarity are always likely to enhance the chance of a manuscript being accepted for publication. A maximum of 1500 words in the main text plus up to 20 references and normally no more than two illustrations (tables or figures or one of each).

#### CASE REPORT

A brief communication presenting collected case reports, or single case reports of clinical or scientific significance. These reports should be concise and focused. They should address observations of patients or families that add substantially to the knowledge of the etiology, pathogenesis and delineation of the natural history or management of the condition described. Brevity and clarity are always likely to enhance the chance of a manuscript being accepted for publication. These manuscripts should be 2000 words or less, with no more than four figures and tables and 30 references.

#### LETTER

Letters to the Editor may be submitted in response to work that has been published in the Journal. Letters should be short commentaries related to specific points of agreement or disagreement with the published work. Letters are not intended for presentation of original data unrelated to a published article. Letters should be no

longer than 500 words with no more than five complete references, and may not include any figures or tables.

## Manuscript Preparation

The Journal requires that all manuscripts be submitted in a single column format that follows these guidelines:

- The manuscript must be submitted in MSWord format.
- All text should be double spaced with 2cm margins on both sides using 11point type in Times Roman or Arial font.
- All lines should be numbered throughout the entire manuscript and the entire document should be paginated.
- All tables and figures must be placed after the text and must be labeled. Submitted papers must be complete, including the title page, abstract, figures, and tables. Papers submitted without all of these components will be placed on hold until the manuscript is complete.

All submissions must include:

- A cover letter requesting that the manuscript be evaluated for publication in ABE&M and any information relevant to your manuscript.

Elsewhere on the submission form authors may suggest up to three specific reviewers and/or request the exclusion of up to three others.

The manuscript must be presented in the following order:

1. Title page.
2. Structured Abstract (or summary for case reports).
3. Main text.
4. Tables and Figures. They must be cited in the main text in numerical order.
5. Acknowledgments,
6. Funding statement, competing interests and any grants or fellowships supporting the writing of the paper
7. Reference list.

### Title Page

The title page must contain the following information:

1. Title of the article (a concise statement of the article's major contents).
2. Full names, departments, institutions, city and country of all coauthors.
3. Full name, postal address, email, telephone and fax numbers of the corresponding author.
4. Abbreviated title of not more than 40 characters for page headings
5. Up to five keywords or phrases suitable for use in an index (it is recommended to use MeSH terms).
6. Word count excluding title page, abstract, references, figures and tables.
7. Article type

### Structured abstracts

All Original Articles, Brief Reports, Reviews, Case Reports should be submitted with structured abstracts of no more than 250 words. The abstract must be self contained and clear without reference to the text and should be written for a general journal

readership. The abstract format should include four sections that reflect the section headings in the main text. All information reported in the abstract must appear in the manuscript. Please use complete sentences for all sections of the abstract.

### **Introduction**

The article should begin with a brief introductory statement that places the work to follow in historical perspective and explains its intent and significance.

### **Materials and methods**

These should be described and referenced in sufficient detail for other investigators to repeat the work. The source of hormones, unusual chemicals and reagents, and special pieces of apparatus should be stated. For modified methods, only the modifications need be described.

### **Results and discussion**

The Results section should briefly present the experimental data in text, tables, and/or figures. For details on preparation of tables and figures, see below. The Discussion should focus on the interpretation and significance of the findings with concise objective comments that describe their relation to other work in that area. The Discussion should not reiterate the Results.

### **Authorship**

The ABE&M ascribes to the authorship and contributor ship guidelines defined by the International Committee of Medical Journal Editors ([www.ICMJE.org](http://www.ICMJE.org)). Unrestricted joint authorship is allowed. A maximum of two corresponding authors is allowed. The uniform requirements for manuscripts submitted to medical journals state that authorship credit should be based only on substantial contribution to:

1. conception and design, or analysis and interpretation of data
2. drafting the article or revising it critically for important intellectual content
3. and final approval of the version to be published.

All these conditions must all be met. The corresponding author is responsible for ensuring that all appropriate contributors are listed as authors and that all authors have agreed to the manuscript's content and its submission to ABE&M.

### **Conflict of interest**

A conflict of interest statement for all authors must be included in the main document, following the text, in the Acknowledgments section. If authors have no relevant conflict of interest to disclose, it should be indicated in the Acknowledgments section.

### **Acknowledgments**

The Acknowledgments section should include the names of those people who contributed to a study but did not meet the requirements for authorship. The corresponding author is responsible for informing each person listed in the acknowledgment section that they have been included and providing them with a description of their contribution so they know the activity for which they are considered responsible. Each person listed in the acknowledgments must give

permission in writing, if possible for the use of his or her name. It is the responsibility of the corresponding author to collect this information.

### **References**

References to the literature should be cited in numerical order (in parentheses) in the text and listed in the same numerical order at the end of the manuscript on a separate page or pages. The author is responsible for the accuracy of references. The number of references cited should be limited, as indicated above for each category of submission.

### **Tables**

Tables should be submitted in the same format as your article (Word) and not another format. Please note: we cannot accept tables as Excel files within the manuscript. Tables should be self-explanatory and the data they contain must not be duplicated in the text or figures. Tables must be constructed as simply as possible and be intelligible without reference to the text. Each table must have a concise heading. A description of experimental conditions may appear together with footnotes at the foot of the table. Tables must not simply duplicate the text or figures.

### **Figures and legends**

All figures must display the figure number. Sizing the figure: The author is responsible for providing digital art that has been properly sized, cropped, and has adequate space between images. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to the authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in print (upon acceptance of the manuscript, the publisher will provide price quotes).

### **Photographs.**

The ABE&M strongly prefers to publish unmasked patient photos. We encourage all prospective authors to work with families prior to submission to address the issue of permission for review and possible publication of patient images. If your submission contains ANY identifiable patient images or other protected health information, you MUST provide documented permission from the patient (or the patient's parent, guardian, or legal representative) before the specific material will be circulated among editors, reviewers and staff for the purpose of possible publication in ABE&M. If it is necessary to identify an individual, use a numerical designation (e.g. Patient 1) rather than using any other identifying notations such as initials.

### **Units of measure**

Results should be expressed in metric units. Temperature should be expressed in degrees Celsius and time of day using the 24-hour clock (e.g., 0800 h, 1500 h).

### **Standard abbreviations**

All abbreviations in the text must be defined immediately after the first use of the abbreviation.

### **Experimental subjects**

To be considered, all clinical investigations described in submitted manuscripts must have been conducted in accordance with the guidelines in The Declaration of Helsinki and must have been formally approved by the appropriate institutional review committees or its equivalent.

The study populations should be described in detail.

Subjects must be identified only by number or letter, not by initials or names. Photographs of patients' faces should be included only if scientifically relevant. Authors must obtain written consent from the patient for use of such photographs. For further details, see the Ethical Guidelines.

Investigators must disclose potential conflict of interest to study participants and should indicate in the manuscript that they have done so.

### **Experimental animals**

A statement confirming that all animal experimentation described in the submitted manuscript was conducted in accord with accepted standards of humane animal care, as outlined in the Ethical Guidelines, should be included in the manuscript.

### **Molecular genetic description**

- Use standard terminology for variants, providing rs numbers for all variants reported. These can be easily derived for novel variants uncovered by the study. Where rs numbers are provided, the details of the assay (primer sequences, PCR conditions, etc.) should be described very concisely.
- Pedigrees should be drawn according to published standards (See Bennett *et al.* *J Genet Counsel* (2008) 17:424–433 DOI 10.1007/s1089700891699).

### **Nomenclatures**

For genes, use genetic notation and symbols approved by the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) – (<http://www.genenames.org/>).

For mutation nomenclature please use the nomenclature guidelines suggested by the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>)

Provide information and a discussion of departures from HardyWeinberg equilibrium (HWE). The calculation of HWE may help uncover genotyping errors and impact on downstream analytical methods that assume HWE.

Provide raw genotype frequencies in addition to allele frequencies. It is also desirable to provide haplotype frequencies.

Whenever possible, drugs should be given their approved generic name. Where a proprietary (brand) name is used, it should begin with a capital letter.

Acronyms should be used sparingly and fully explained when first used.

### **For Papers Submitted In English**

Papers must be written in clear, concise English. Avoid jargon and neologisms. The journal is not prepared to undertake major correction of language, which is the responsibility of the author. Where English is not the first language of the authors, the paper must be checked by a native English speaker. For nonnative English speakers and international authors who would like assistance with their writing before submission, we suggest American Journal Experts for their scientific editing service (<http://www.journalexperts.com/index.php>) or PaperCheck (<http://www.papercheck.com/>).

### **10.3 ANEXO C – Artigo a ser submetido**

#### **EFEITO DA TERAPIA DE CHOQUE TÉRMICO SOBRE O PERFIL LIPÍDICO E CONCENTRAÇÃO DE HSP70, EM RATAS WISTAR OVARIECTOMIZADAS: PRÓS E CONTRAS**

Yana Picinin Sandri Lissarassa<sup>1,2</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>1,2</sup>, Mirna Stela Ludwig<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Atenção Integral à Saúde, Universidade de Cruz Alta-UNICRUZ, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUI

<sup>2</sup> Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF. Departamento de Ciências da Vida – DCVida. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUI

#### **RESUMO**

##### **Objetivo**

Avaliar o efeito da terapia de choque térmico sobre parâmetros biométricos, bioquímicos, estado redox e a concentração de proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70), em ratas Wistar ovariectomizadas.

##### **Materiais e Métodos**

32 ratas Wistar, adultas, foram divididas nos grupos C (controle) e TCT (terapia de choque térmico), ambos submetidos à falsa cirurgia; OVX (ovariectomia) e OVX + TCT (ovariectomia + terapia de choque térmico). a terapia de choque térmico (1X/semana, durante 12 semanas) consistiu em banho quente (42° C) em animais anestesiados com temperatura

retal de 41 - 41.5 °C, por 15 minutos. Foram avaliados parâmetros biométricos, bioquímicos e de estresse oxidativo do tecido adiposo e a concentração intra e extracelular de HSP70.

### **Resultados e Discussão**

O ganho de peso foi atenuado nos animais do grupo OVX+TCT. A fração HDL e a concentração de triglicerídeos foram maiores no grupo OVX+TCT vs OVX e C. O grupo OVX apresentou menor atividade da enzima catalase no tecido adiposo, predispondo-os à lipoperoxidação. O conteúdo de HSP70 no tecido adiposo foi maior no grupo OVX + TCT vs OVX, sugerindo efeito citoprotetor da terapia térmica. A concentração de HSP70 (eHSP72, forma induzível) plasmática foi maior nos animais submetidos a TCT (vs C), porém, este efeito não foi detectado entre OVX vs OVX+TCT.

### **Conclusões**

A terapia térmica como estratégia terapêutica apresenta aspectos prós e contras na ausência de estrogênio, pois resulta em efeitos citoprotetores e biométricos desejáveis e efeitos ambíguos sobre o metabolismo lipídico.

**Palavras chave:** ovariectomia, terapia de choque térmico, HSP70, colesterol, triglicerídeos, Tecido adiposo

### **ABSTRACT**

#### **Objectives**

To evaluate the effect of heat shock therapy on biometric, biochemical redox state parameters and 70 kDa heat shock proteins (HSP70) concentration in ovariectomized rats.

#### **Materials and methods**

32 Wistar adult rats were divided in following groups: C (control) and TCT (heat shock therapy), both sham-operated; OVX (ovariectomy) and OVX + TCT (ovariectomy + heat

shock therapy),. C and OVX groups were maintained normothermic while OVX + TCT and TCT group were submitted to heat shock therapy (1X / week for 12 weeks), which consisted of hot bath (42 ° C) to increase rats rectal temperature up to 41 - 41.5 ° C. Were analyzed biometric, biochemical and oxidative stress parameters in adipose tissue and intra and extracellular concentration of HSP70.

### **Results and discussion**

The weight gain was attenuated in OX + TCT group. The HDL fraction and triglycerides concentration were higher in OVX + TCT vs OVX and C groups. There was less catalase enzyme activity in ovariectomized animals, predisposing to lipid peroxidation. The HSP70 content was higher in the OVX + TCT group vs OVX, suggesting cytoprotection. The concentration of plasma inducible form of HSP70 (eHSP72) was higher in animals from TCT group (vs C), however this effect was not observed between OVX vs OVX + TCT.

### **Conclusions**

Heat shock therapy as therapeutic strategy presented pros and cons effects since results in cytoprotective and biometric benefits and in other hand presents ambiguous effects on lipid metabolism.

**Keywords:** ovariectomy, heat shock therapy, HSP70, cholesterol, triglycerides, adipose tissue

## INTRODUÇÃO

A perda da produção e ação estrogênica, natural ou induzida, predispõe o organismo feminino a uma condição de estresse metabólico, com implicações na massa corporal, no metabolismo da glicose e dos lipídeos, na atividade do sistema imune, consequentemente elevando o risco de doenças cardiometabólicas. A contraindicação e os efeitos adversos da terapia de reposição hormonal para a população feminina sob maior risco cardiometabólico, suscita a necessidade de estudos acerca de novas abordagens terapêuticas não hormonais e seus efeitos sobre mecanismos endógenos de citoproteção (1)

Dentre as abordagens terapêuticas destaca-se a terapia de choque térmico, utilizada como um fator de indução da expressão de proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) (2,3) que, por conseguinte, pode representar um importante mecanismo de citoproteção, contribuindo para a redução do risco de doença metabólica inflamatória, especialmente em organismos mais susceptíveis, como organismos com baixa concentração de estrogênio. As HSP70 integram um mecanismo de defesa celular complexo e altamente conservado, e desempenham papel fundamental durante a síntese, montagem, dobramento e degradação de proteínas, atuando assim na preservação da sobrevivência celular sob condições adversas (4).

Em ratas recém ovariectomizadas, onde os níveis de estrogênio circulante começam a cair, a resposta celular ao estresse (capacidade de síntese de HSP70 e de exportação da forma induzível de 72kDa para a circulação - eHSP72) e parâmetros de estresse oxidativo ainda não estão alterados, e uma sessão de terapia térmica parece não trazer prejuízos ou benefícios. Porém não há informações sobre os efeitos do tratamento em animais por período mais estendido. Assim, a hipótese é de que a terapia de choque térmico, pela indução da expressão de HSP70, possa atenuar o desequilíbrio metabólico, causado pela

falta de estrogênio, trazendo benefícios sobre parâmetros biométricos, bioquímicos, e de estresse oxidativo em ratas Wistar ovariectomizadas.

## **METODOLOGIA**

**Animais.** 32 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 20 semanas de idade, provenientes do biotério da UNIJUI foram mantidas sob ciclo claro/escuro 12h/12h, temperatura ambiente de 22±2°C, com dieta comercial (NUVILAB®) e água *ad libitum*.

**Delineamento experimental.** Aprovado CEUA-UNIJUI, Parecer n. 003/2015. Antes do início das intervenções os animais foram analisados biometricamente e submetidos ao teste de tolerância a glicose (GTT) e em seguida distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais: ovariectomizados, com remoção de ambos ovários, e controle, submetidos a falsa cirurgia. Após 7 dias de pós-operatório, foram redistribuídos em 4 grupos: C (controle) e TCT (terapia de choque térmico), ambos submetidos à falsa cirurgia; OVX (ovariectomia) e OVX + TCT (ovariectomia + terapia de choque térmico). Os grupos C e OVX foram mantidos normotérmicos e os grupos TCT e OVX+TCT, submetidos a terapia de choque térmico.

Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram submetidos à anestesia utilizando medicação pré-anestésica: morfina 5 mg/kg IP; Indução: isoflurano a 4% inalatório; Manutenção: isoflurano a 2% inalatório e no pós-operatório: morfina 5 mg/kg (s.c.) a cada 4h por 24 horas. A ovariectomia (OVX) envolveu a remoção bilateral dos ovários. Os animais não ovariectomizados foram submetidos à falsa operação, com seus ovários expostos cirurgicamente e, a seguir, reposicionados para posterior sutura da musculatura e pele.

**Consumo de água, de ração e calórico e perfil biométrico.** O consumo de água e ração foi avaliado semanalmente, pela relação entre a oferta e o consumo: [(oferta total/caixa – consumo total/caixa) / número de animais por caixa] (5). Para a avaliação do consumo

calórico, foi considerado a quantidade de calorias da dieta padrão de 16,6MJ/Kg) = 16,6KJ por grama (6).

**Terapia de choque térmico.** A terapia de choque térmico foi iniciada 7 dias após o procedimento cirúrgico. Todos os grupos foram anestesiados, (xilazina 10 mg.kg<sup>-1</sup> e cetamina 90 mg.kg<sup>-1</sup> i.p.). Os grupos TCT e TCT+OVX foram submetidos à terapia de choque térmico, que consistiu em banho quente (42° C), com monitoramento de temperatura retal entre 41 - 41.5°C, por 15 minutos, 1X/semana, durante 12 semanas (3,7,8). Os grupos C e OVX foram mantidos em banho com água de 37 °C e temperatura corporal entre 36,5 e 37,5 °C. Após os animais foram secos, mantidos cobertos com toalhas com temperatura ambiente de 24 °C até recuperação da anestesia e receberam solução fisiológica (2,5 mL, v.o.), para hidratação e após recuperação foram levados de volta ao biotério.

**Perfil glicêmico.** A glicemia de jejum e o teste de tolerância a glicose (GTT) foram realizados com animais em jejum de 12 horas, no tempo zero (antes da cirurgia), na 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana de terapia de choque térmico. Foi administrada solução de glicose 80% (m/v), 1g/kg (i.p.). Foi realizado teste de tolerância insulina (ITT) no tempo zero e na 10<sup>a</sup> semana, sendo utilizada Insulina Humalog Lispro – Lilly 100 UI/mL, de ação rápida, diluída em PBS pH 7,4 e administrada na dose de 1UI/kg (i.p.). Para a obtenção da curva glicêmica, a glicemia foi mensurada antes, 30 e 120 minutos após a injeção de insulina (ITT) ou glicose (GTT), ambos, 48h após a última sessão de choque térmico.

**Coleta de material biológico.** Após 12 semanas os animais foram eutanasiados 72 horas após a última sessão de choque térmico, com guilhotina especial para roedores, sendo coletado o sangue para obtenção do plasma, usado para análises hematológicas, bioquímicas, de estresse oxidativo e da concentração de eHSP72. Foi coletado o tecido adiposo branco abdominal, o qual foi congelado em nitrogênio líquido e mantido em congelador para posterior análise de HSP70, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).

**Preparação dos tecidos para gel para eletroforese e análise de parâmetros de estresse oxidativo.** Para a análise da atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), uma porção do tecido adiposo foi homogeneizado em tampão de fosfato de potássio pH 7,4 e para determinar a expressão iHSP70 por *Western blotting*, outra porção do tecido foi homogeneizada em tampão dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%. (w / v). O tecido foi homogeneizado (ainda congelado) nos respectivos tampões, contendo inibidor de protease (PMSF). Após homogeneização coletou-se o infranadante para análises.

**Dosagem de Proteínas:** A concentração de proteína no plasma e nos tecidos homogeneizados foi determinada pelo método espectrofotométrico de Bradford, a 595nm, utilizando curva padrão de albumina (9).

**Teste das substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico – TBARS.** A determinação da peroxidação lipídica foi realizada pela técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (10).

**Determinação do conteúdo das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).** A análise da atividade de SOD foi realizada pela técnica de inibição da auto-oxidação do pirogallol (11). A atividade da Catalase (CAT) foi realizada de acordo com a descrição de Aebi (1984) (12).

**Concentração plasmática de eHSP72.** 25 µl de plasma foi diluído 1:4 em tampão de ensaio para dosagem da concentração de eHSP72 conforme especificação do Kit High sensitivity anti-HSP70 Elisa kit *Enzo Life Sciences EKS-715* (450 nm).

**Parâmetros bioquímicos.** As dosagens das transaminases foram realizadas por metodologia cinética com soro. Os triglicérides, colesterol total e lipoproteínas foram realizados por metodologias colorimétricas, com dosagens diretas. Para realização destas análises foram utilizados kits da Bioclin – Quibasa e realizadas através da automação

BS200- Mindray. Para a determinação do colesterol LDL foi utilizada a fórmula de Friedewald (13).

**Dosagem de 17 $\beta$  estradiol.** Utilizou-se amostra de soro e realizou-se uma dosagem quantitativa através do sistema automático ADVIA Centaur XP (Siemens Helthcare Diagnosis), por metodologia de quimioluminescência, com sensibilidade e limites do ensaio *in vitro* entre 11,8 e 3.000 pg/mL. Essas análises foram realizadas através do Laboratório Álvaro (DASA).

**Concentração de HSP70 intracelular (iHSP70).** A expressão de HSP70 no foi realizada por *western blotting* (14). Para cada amostra foram realizadas 2 separações por eletroforese, sendo uma para imunodeteccção e quantificação da proteína de interesse (HSP70) e outro para quantificação do normalizador, actina. Para imunodeteccção de HSP70 (70kDa) as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF por eletrotransferência (1h à 100 V) e, subsequentemente, as bandas transferidas serão visualizadas com 0,3% (w / v) de Red Ponceau S (Sigma-Aldrich). As membranas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem TBS-Tween 0,1% (cada lavagem com duração de 10 minutos, totalizando 30 minutos ao todo), em seguida foram blotadas com 10% (w/v) de leite em pó em TBS-Tween 0,1% por 30 minutos. Após, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147) (1:1000), seguido de três lavagens com TBS-Tween 0,1%, em seguida incubadas com segundo anticorpo contendo peroxidase (Sigma A9044) (1:15000) e lavadas novamente como o procedimento padrão. A visualização das bandas foi realizada utilizando Reagente ECL-Prime Western blot (GE Healthcare). Para a quantificação do normalizador Actina (43 kDa), o segundo gel de cada amostra foi corado com Coomassie Blue e em seguida passaram por processos de lavagem de Ácido Acético 5% até ótima visualização das bandas. A quantificação das bandas foi realizada utilizando o programa Image J<sup>®</sup>. Os dados foram apresentados em unidades

arbitrárias de HSP70 normalizados em por actina (43kDa). Os resultados foram expressos relativos ao grupo controle.

**Índice H – Índice da razão da [eHSP70/iHSP70].** O índice H foi recentemente descrito como índice geral do estado imunoinflamatório, com base na relação entre a concentração de HSP70 em monócitos / macrófagos e valores séricos (5). Se alguém toma  $R_c = [eHSP70]_c / [iHSP70]_c$  como a razão HSP70 em uma situação de controle, sejam quais forem as técnicas utilizadas para avaliar cada eHSP70 e iHSP70, então índice H pode ser calculado como o quociente de qualquer  $R_j = [eHSP70]_j / [iHSP70]_j$  por  $R_c$ , que será, portanto, considerada como a unidade ( $R_c = 1$ ), normalizando todos os resultados restantes nesta situação de "j". Assim, índice  $H = R_j / R_c$  pode permitir comparações entre qualquer situação estressante "j" e que a situação assumida como controle é um. O índice H pode ser aplicado para estimar o estado imune em muitas situações diferentes. Valores de índice H superiores a 5 denotam uma resposta pró-inflamatória exacerbada e valores de índice H entre 0 e 1, indicam um estado predominantemente anti-inflamatório.

**Análise estatística.** O tratamento estatístico foi desenvolvido por procedimentos descritivos (medidas de tendência central e dispersão) e inferenciais (ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls ou Dunnett's) no programa GraphPad Prism 5.0. Para eHSP72 foi usada normalização com escala logarítmica, com  $\log^{10}$ , para análise por teste estatístico paramétrico (ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey).

## RESULTADOS

A dosagem do hormônio  $17\beta$  estradiol foi realizada 12 semanas após a cirurgia e os animais dos grupos OVX e OVX+TCT, que tiveram a remoção bilateral dos ovários, apresentaram uma redução hormonal de 20% em relação as que não fizeram a remoção (C e TCT) (tabela 1).

Com disponibilização de ração *ad libitum*, todos os grupos apresentaram um consumo calórico semelhante (tabela 1) e ganho de peso no decorrer das 12 semanas (tabela 1), contudo, os valores relativos a variação do peso entre o início e final do tratamento ( $\text{Peso}_{\text{final}} - \text{Peso}_{\text{inicial}}$ ), comparativamente entre os grupos, evidenciam um maior ganho ponderal no grupo OVX. O ganho ponderal observado no grupo OVX + TCT foi atenuado (vs OVX) (tabela 1).

A ovariectomia causou aumento na concentração de colesterol total e da fração LDL em ambos grupos ovariectomizados. Porém, a fração HDL colesterol foi maior somente no grupo OVX+TCT. Em relação aos triglicerídeos, observa-se uma maior concentração deste lipídeo circulante no grupo OVX + TCT comparado os grupos OVX e C.

Todos animais se apresentaram normoglicêmicos em jejum, em qualquer dos tempos e condições experimentais. O mesmo aconteceu em relação ao teste de tolerância a glicose e insulina (tabela 1).

Quanto ao conteúdo de eHSP72 foi observado um aumento na concentração plasmática desta proteína no grupo TCT comparado ao grupo C. A concentração de eHSP72, porém, não difere entre os grupos de animais ovariectomizados (OVX vs OVX+TCT), e observa-se grande variabilidade na concentração desta proteína entre os animais do grupo OVX + TCT.

A avaliação do estado redox do tecido adiposo (tabela 1) indica aumento da concentração de MDA, indicando maior nível de lipoperoxidação no grupo OVX + TCT vs C, bem como, uma menor concentração da enzima CAT nos grupos OVX e OVX + TCT quando comparados aos grupos C e TCT.

A resposta ao estresse no tecido adiposo (figura 1A), avaliada por meio do conteúdo de iHSP70, revela aumento da expressão desta proteína no grupo OVX+TCT ( $p= 0,0171$ ) vs OVX.

Com base na concentração de eHSP72 e no conteúdo de iHSP70 do tecido adiposo, foi calculado e analisado o Índice H e os valores relativos a este índice (figura 1C) não revelam diferenças entre os grupos experimentais.

## **DISCUSSÃO**

Estudos acerca da temática menopausa, em mulheres e/ou em modelos de animais ovariectomizados, têm se tornado cada vez mais relevantes devido à alta prevalência de obesidade ou sobrepeso e dislipidemia, frequentemente relatadas em mulheres pós-menopáusicas, podendo estar relacionadas com o estilo de vida moderno, (1, 15, 16) e/ou com a baixa disponibilidade de estrogênio *per se* (17, 18, 19, 20, 21).

Neste estudo todos os animais, apresentaram aumento na massa corporal ao longo das 12 semanas de tratamento (tabela 1) porém, o grupo OVX foi o único a apresentar aumento significativo de peso entre a primeira a última semana de tratamento, independentemente do consumo calórico, visto que os valores relativos a esta variável foram semelhantes entre os grupos experimentais (tabela 1). Estes dados sugerem o efeito direto da falta de estrogênio sobre a regulação do peso corporal e corroboram com outros estudos realizados em humanos e modelos experimentais (22, 23), os quais mostram que a falta de estrogênio *per se* influencia a regulação e a manutenção do peso corporal, a favor do seu aumento, o que pode estar relacionado ao menor dispêndio de energia (17, 19).

A terapia de choque térmico (TCT) foi capaz de atenuar o ganho ponderal, pois não foi detectada diferença no ganho de peso entre o grupo OVX + TCT e os grupos C e TCT, o que sugere um efeito protetor da terapia de choque térmico em organismos com baixa disponibilidade de estrogênio. Este resultado assemelha-se ao observado em outros estudos com modelos experimentais de obesidade e resistência insulínica (3) e em estudos com humanos (24) e revela ineditamente a TCT como uma interessante estratégia não farmacológica para o período pós-menopausa, considerando que aumento da massa

corporal e, principalmente de gordura abdominal, comuns nesta fase, estão fortemente correlacionadas com aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer de mama e diabetes mellitus tipo 2 (25).

O efeito benéfico da TCT sobre o controle do peso corporal pode estar relacionado à expressão de iHSP70, pois, conforme outros estudos, o aumento na expressão desta proteína no músculo esquelético é capaz de impedir o aumento do peso corporal induzido pela dieta hiperlipídica. Esse efeito parece ser decorrente de um aumento na atividade enzimática mitocondrial, sugerindo que a expressão de iHSP70 tecidual possa ter efeito sobre o gasto de energia (3).

Heine e colaboradores (2000), evidenciaram que a falta de estrogênio pode estar associada com prejuízos no metabolismo da glicose, o que não foi observado em nosso estudo (17). Todos animais mantiveram a homeostase glicêmica independente da ovariectomia ou demais alterações biométricas, como ganho de peso e alterações bioquímicas.

O declínio dos níveis de estrogênio também pode emergir ou agravar dislipidemias, resultando na predominância de partículas densas de LDL e a redução das partículas antiaterogênicas, a HDL (26). Os resultados das análises bioquímicas relativas ao perfil lipídico em nosso estudo (tabela 1) confirmam concentração maior de colesterol total nos animais ovariectomizados, comparado aos grupos C e TCT (tabela1). Jensen e colaboradores (1990) mostram que, seis meses após a menopausa, os níveis de colesterol total (CT) e a fração LDL se elevam entre 5 e 10% e, em dois anos, a fração HDL diminui em aproximadamente 6% (27) No nosso estudo, em modelo experimental, a elevação da colesterolemia foi observada 13 semanas após a ovariectomia, com modificações nas frações. Os resultados da fração LDL colesterol (colesterol “ruim”) mostram um aumento de 83,4% desta lipoproteína no grupo OVX, em relação ao controle (tabela 1). Porém, quanto a fração HDL colesterol (colesterol “bom”), observa-se um desfecho importante quando se comparam os grupos de animais ovariectomizados com e sem terapia de choque térmico: os

animais submetidos a terapia térmica (OVX + TCT) apresentam maior concentração desta lipoproteína comparado ao grupo OVX, sendo a diferença de cerca de 24% a mais no grupo OVX + TCT.

O aumento da fração HDL colesterol pode representar um importante fator de proteção cardiovascular, especialmente em organismos mais susceptíveis ao desenvolvimento de anormalidade e agravos metabólicos, como é o caso em estudo. Alguns trabalhos de investigação mostram que o aumento de 1 mg/dL na concentração de HDL colesterol corresponde a uma redução de 3,2% no risco de doença coronariana, em mulheres na menopausa (28). Neste contexto, o resultado obtido com o grupo OVX + TCT pode representar um importante benefício da terapia de choque térmico em organismos com baixa disponibilidade de estrogênio, mais susceptíveis ao desenvolvimento de alterações aterogênicas.

Entretanto, se por um lado a terapia térmica parece produzir efeito protetor antiaterogênico em ratas ovariectomizadas, considerando o exposto acima, por outro, parece interferir negativamente sobre a concentração de triglicerídeos, uma vez que o grupo OVX + TCT apresentou maior concentração deste lipídeo circulante quando comparado aos grupos OVX e C (Tabela 1). A concentração elevada de triglicerídeos, observada em nosso estudo, pode estar associada à diminuição da atividade da enzima lipase lipoprotéica. Entre os fatores reguladores da atividade da LPL no tecido adiposo está a disponibilidade de outros nutrientes como a glicose e a presença de hormônios, como catecolaminas adrenalina e noradrenalina. A adrenalina estimula a lipólise no tecido adiposo e a liberação de ácidos graxos na circulação (29).

Estudo realizado por Tomiyama e colaboradores (2015), no qual indivíduos sadios foram submetidos a uma sessão diária (20 minutos) de terapia térmica, por sete dias, mostra que, após uma semana de tratamento, o nível sanguíneo de adrenalina e cortisol diminuiu, indicando a supressão da atividade do sistema nervoso simpático pela terapia térmica (30).

Assim, como hipótese, pois não mensuramos a concentração circulante de catecolaminas, pode-se supor que a terapia de choque térmico possa estar causando redução na concentração desses hormônios (catecolaminas) e de que esta redução possa ter implicações sobre a lipólise e conseqüentemente, sobre a concentração de TG circulante observada neste estudo.

A terapia de choque térmico provocou um aumento na concentração plasmática de eHSP72 em animais não ovariectomizados (TCT), o que não foi observado nos animais ovariectomizados (figura 1A). Contudo, a grande variabilidade na concentração de eHSP72 nos grupos OVX + TCT indica uma menor capacidade de resposta ao estresse (térmico e metabólico) em alguns animais ovariectomizados, sugerindo papel relevante da falta de estrogênio.

A avaliação de variáveis de estresse oxidativo e o conteúdo de iHSP70 no tecido adiposo, sugere uma sensibilidade deste tecido à TCT em condições de baixa disponibilidade de estrogênio. A maior expressão de iHSP70 no grupo OVX +TCT evidencia uma resposta de defesa deste tecido metabólico. Esta resposta pode estar associada também a maior nível de lipoperoxidação neste grupo experimental. A redução crônica da disponibilidade de estrogênio influenciou o equilíbrio redox neste tecido, o que pode ser evidenciado pela baixa atividade da enzima catalase nos grupos OVX e OVX+TCT.

Há que se considerar que, na condição de hipoestrogenismo e alterações metabólicas lipídicas decorrentes, o tecido adiposo possa apresentar maior fragilidade. O aumento da expressão de iHSP70, neste caso, pode representar uma resposta tecidual anti-inflamatória importante. O estresse tecidual induzido por calor, estimula a expressão de HSP72, cujos efeitos intracelulares conferem citoproteção contra estresse proteotóxico. As ações anti-inflamatórias da iHSP70 residem, especialmente, no seu efeito inibitório sobre a ativação e translocação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (31). Esta ação tem implicação no

sistema imunológico, em processos inflamatórios e em fatores reguladores da sobrevivência celular e do apoptose (32).

Também analisamos o índice da razão entre os conteúdos de HSP70 extracelular/intracelular (índice H), descrito como índice geral do estado imunoinflamatório (5). Esta proposição fundamenta-se no fato de que uma maior concentração de eHSP70 associa-se a prevalência de sinais pró-inflamatórios e agravos em doenças cardiometabólicas. Por outro lado, para cada situação em particular, quanto mais células são capazes de responder a estímulos de estresse, elevando o conteúdo intracelular de iHSP70 (iHSP70), como uma resposta anti-inflamatória (33, 34), maior a chance de manutenção da homeostase metabólica, inflamatória e redox. Neste sentido, o índice H calculado em condição experimental mostram valores médios próximos à 01 (um) (figura 1C), o que sugere uma condição de equilíbrio quanto a este biomarcador de status inflamatório.

## **CONCLUSÃO**

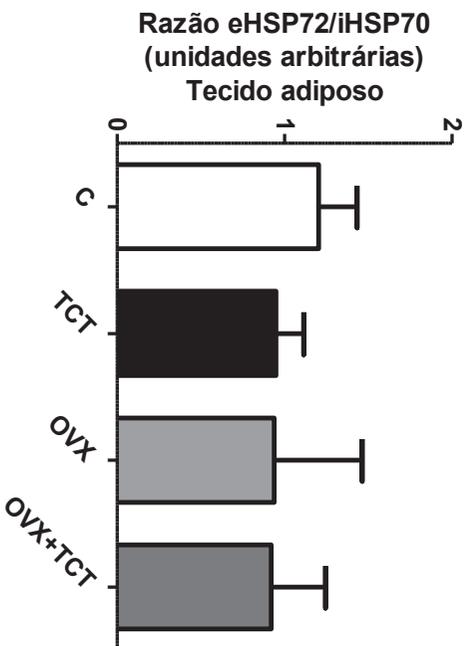
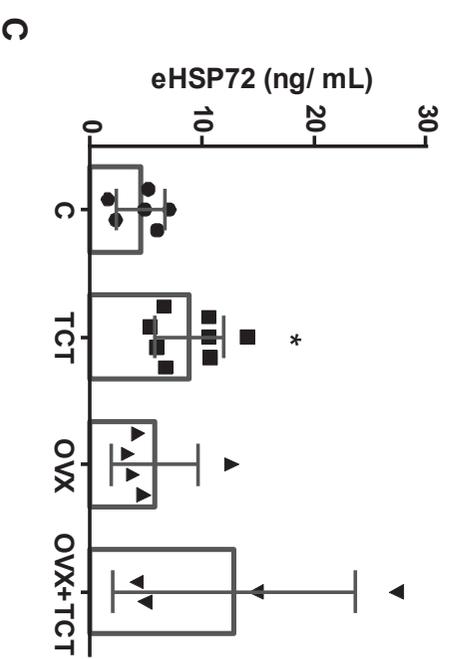
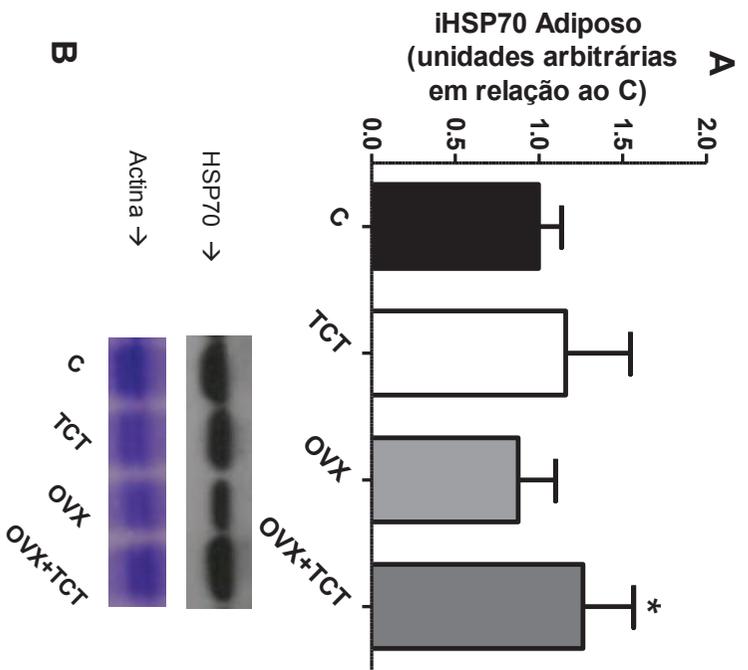
A terapia térmica como estratégia terapêutica apresenta aspectos prós e contra na ausência de estrogênio, pois resulta em efeitos citoprotetores e biométricos desejáveis, porém efeitos ambíguos sobre o metabolismo lipídico.

**Tabela 1. Consumo de ração, perfil biométrico, hormonal, bioquímico e parâmetros de estresse oxidativo do tecido adiposo**

	C	TCT	OVX	OVX+TCT	Anova (valor de <i>P</i> )
Consumo ração (g/dia)	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	0,2743
	10,1 ± 0,45 167,66 kcal	10,6 ± 0,66 175,96 kcal	10,4 ± 1,54 172,67 kcal	11,2 ± 0,86 185,92 kcal	
Consumo calórico	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	0,3216
	12,9 ± 2,74 214,14 kcal	14,3 ± 0,72 237,38 kcal	13,5 ± 0,82 224,10 kcal	12,8 ± 2,18 212,48 kcal	
IMC	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	0,4517
	0,54 ± 0,01	0,54 ± 0,02	0,55 ± 0,02	0,56 ± 0,01	
Peso (g)	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	0,9565
	212,4 ± 4,6	211,9 ± 10,0	212,0 ± 13,2	209,9 ± 3,6	
Ganho de Peso (g)	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	0,1030
	227,7 ± 11,1	222,3 ± 9,4	241,7 ± 21,9	232,4 ± 18,9	
17β-estradiol (pg/mL)	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	0,0233
	15,3±8,78	10,4±8,14	29,7±14,6**	22,5±17,6	
Colesterol total (mg/dL)	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	0,0058
	33,7 ± 4,99	26,4±4,86	25,2±4,08*	23,9±0,71*	
Colesterol HDL (mg/dL)	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	0,0077
	61,7±6,7	69,2±9,4	79,0±11,6*	82,4±15,0*	
Colesterol LDL (mg/dL)	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	0,0026
	21±2,5	21,8±1,7	23±3,8	28,6±4,2**	
Triglicerídeos (mg/dL)	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	<0,0001
	24,5±4,5	28,1±9,2	45,1±7,8*	39,4±8,8*	
Triglicerídeos (mg/dL)	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	0,0099
	74,8±8,7	94,6±21,3	70,6±23,3	110,18,2**	

Glicemia (mg/dL)	jejum	79,8±8,5	83,8±8,4	80,5±7,3	82,3±8,0	0,1810
SOD (U/mg proteína)		0,756±0,369	0,706±0,124	0,985±0,368	0,756±0,233	0,2599
CAT (U/mg proteína)		23,18±5,20	20,27±9,53	13,60±4,25*	12,76±4,63*	0,0096
TBARS (mml MDA/mg proteína)	9	0,5064±0,21	0,3605±0,161	0,4765±0,238	1,251±0,390**	<0,0001

**Tabela 1. Consumo de ração, Índice de massa corporal (IMC) e Peso corporal**, inicial e final: ANOVA de duas vias e ANOVA de medidas repetidas, seguido pelo teste de Tukey. **Ganho de peso** (Peso<sub>final</sub> – Peso<sub>inicial</sub>): \*\*OVX vs C e OVX vs TCT, ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey, P <0,05. **Dosagem de 17 β estradiol**: \* vs C, ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. **Dosagens de colesterol total (CT), colesterol HDL, colesterol LDL e triglicerídeos**: Colesterol total \* vs C; HDL \*\* vs todos os grupos; LDL \* vs C; Triglicerídeos \*\* vs C e OVX, ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Tukey. **Parâmetros de estresse oxidativo**: Superóxido dismutase (SOD); Catalase (CAT) \* vs C; Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) \*\* vs C e TCT, ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. Grupos experimentais: Controle (C), Terapia de Choque Térmico (TCT), Ovariectomia (OVX), Ovariectomia + Terapia de Choque Térmico (OVX+TCT). Resultados expressos como média ± DP. N (6-9)



**Figura 1.** (1A) Valores de iHSP70 normalizados pelo conteúdo celular e  $\beta$  actina, \* vs C,  $P < 0,05$ , ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. (1B) Concentração plasmática de eHSP72, por metodologia de ELISA, \* C vs TCT para  $P < 0,05$ , ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. (1C) Índice H. Grupos experimentais: Controle (C), Terapia de Choque Térmico (TCT), Ovariectomia (OVX), Ovariectomia + Terapia de Choque Térmico (OVX+TCT). Resultados expressos como média  $\pm$  DP. N (6-9).

## REFERÊNCIAS

1. SHOENACKER DA.; JACKSON CA.; ROWLANDS JV.; MISHRA GD. Socioeconomic position, lifestyle factor and age at natural menopause: a systematic review and meta-analyses of studies across six continents. **Int J Epidemiol**, v.43, n.5, p. 1542-1562, 2014.
2. KURUCZ I, MORVA, A; VAAG, A; ERIKSSON, K.F; 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, abril, 2002.
3. CHUNG J; NGUYEN AK.; HENSTRIDGE DC; HOLMES AG; CHAN, MH; MESA JL; LANCASTER GI; SOUTHGATE RJ; BRUCE CR; DUFFY S.; HORYATH I; MESTRIL R; WATT MJ; HOOPER PL; KINGWELL B A; VIGH L; HEVENER A; FEBBRAIO MA. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, n.5, p. 1739-1744, 2008.
4. KAMPINGA HH; HAGEMAN J; VOS MJ.; KUBOTA H; TANGUAY RM; BRUFORD EA; CHEETHAM ME; CHEN B; HIGHTOER E. Guidelines for nomenclatures of the human heat shock proteins. **Cell Stress and Chaperones**, v. 14, p. 105-111, 2009.
5. GOETTEMES-FIORIN P B; GROCHANKE BS ; BALDISSERA FG; DOS SANTOS, AB; HOMEM DE BITTENCOURT JR PI; LUDWIG MS; RHODEN CR; HECK TG. Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development in high-fat diet-treated mice: stress response and extracellular to intracellular HSP70 ratio analysis. **J Physiol Biochem**, 2016.
6. BOCK PM. Efeito da suplementação de glutamina e dipeptídeo L-ALANIL-L-GLUTAMINA sobre a expressão de proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) e a sinalização da insulina em camundongos tratados com dieta hiperlipídica. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
7. BATHAIE SZ; JAFARNEJAD A; HOSSEINKHANI S; NAKHJAVANI M. The effect of hot-tub therapy on serum Hsp70 level and its benefit on diabetic rats: A preliminary report. **Int. J. Hyperthermia**, v. 26, n.6, p. 577-585, 2010.
8. LUDWIG MS. Proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) ligam-se à insulina na circulação sanguínea modulando a disponibilidade de glicose circulante. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

9. BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-54, may., 1976.
10. BUEGE JA; AUST SD. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v.52, p. 302-309, 1978.
11. MARKLUND S; MARKLUNG G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, v. 47, p. 469-474, 1974.
12. AEBI H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**. p. 105-121, 1994.
13. FRIEDEWALD WJ; LEVY RJ; FREDRIKSON DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem.**, v. 18, n.6, p. 499-502, 1972.
14. LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.259, p.680-685, 1970.
15. NELSON HD. Menopause, **Lancet**, v. 1, n. 371, p. 760-770, mar. 2008.
16. NAHAS EAP; NAHAS-NETO J; ORSATTI CL; SOBREIRA ML; TARDIVO AP; WITKIN SS. Evaluation of clinical and inflammatory markers of subclinical carotid atherosclerosis in postmenopausal women, **Menopause**, v. 21, n. 9, p. 982-989, sep 2014.
17. HEINE PA; TAYLOR JA; IWAMOTO GA; LUBAHN COOKE PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- $\alpha$  knockout mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, p. 12729-34, 2000.
18. CLEGG DJ; BROWN LM; WOODS SC; BENOIT SC. Gonadal Hormones Determine Sensitivity to Central Leptin and Insulin. **Diabetes**, v. 55, p. 978-987, 2003.
19. CAMPOREZ JPG; JORNAYVAZ FR; LEE HY; SHOICHI K; GUIGNI BA; KAHN M; SAMUEL VT; CARVALHO CRO; PETERSEN KF; JURCZACK MJ; SHULMAN GI. Cellular Mechanism by Which Estradiol Protects Female Ovariectomized Mice From High-Fat Diet-Induced Hepatic and Muscle Insulin Resistance. **Endocrinology**, v. 154, n. 3, p.1021-1028, mar. 2013.

20. GEIGER PC; GUPTA AA. The Role of Estrogens in the Regulation of Peripheral Glucose Dynamics. **Integrative Biology of Women's Health**, p. 67-86, 2013.
21. MIRAGEM AA; LUDWIG MS; HECK TG; BALDISSERA FG; SANTOS AB; FRIZZO M N; BITTENCOURT Jr. PIH. estrogen deprivation does not affect vascular heat shock response in female rats: a comparison with oxidative stress markers. **Mol Cell Biochem**, Jun 2015.
22. SIBONGA JD; LOTINUM S; EVANS GL; PRIBLUDA VS; GREEN SJ; TURNER RT. Dose-response effects of 2-methoxyestradiol on estrogen target tissues in the ovariectomized rat. **Endocrinology**, v. 144, n.3, p. 785-792, 2003.
23. SPANGENBURG EE; JACKSON KC. The Contribution of Ovarian Hormones to the Cellular Regulation of Lipid Metabolism. **Integrative Biology of Women's Health**, p. 53-66, sep. 2013.
24. HOOPER PL; BALOGH G; RIVAS E; KAVANAGH K; LASZLO V. The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes, **Cell Stress and Chaperones**, 19:447–464, 2014.
25. CHEN Z; BASSFORD T; GREE SB; CAULEY JA; JACKSON RD. Postmenopausal hormone therapy and body composition, a substudy of the estrogen plus progestin trial of the Women's Health Initiative. **Am J Clin Nutr** , v. 8s, n.3, p. 651-656, 2005.
26. CARR M. The Emergence of the Metabolic Syndrome with Menopause. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 6, p. 2404-2411, 2003.
27. JENSEN J; NILAS J; CHRISTIANSEN C. Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. **Maturitas**, v. 12, n.4, p. 321-331, 1990.
28. STEVENSON JC; CROO KD; GODSLAND IF. Influence of age and menopause on serum lipids and lipoproteins in healthy women. **Atherosclerosis**, v. 98, p. 83-90. 1993.
29. GUYTON, A. & HALL, J.E. Guyton & Hall. Textbook of medical physiology. 13<sup>a</sup>ed, Elsevier, 2015..
30. TOMIYAMA C; WATANABE M; HONMA T; INADA A; HAYAKAWA T; RYUFUKU M; ABO T. The effect of repetitive mild hyperthermia on body temperature, the autonomic nervous system, and innate and adaptive immunity. **Biomedical Research**, v. 36, n.2, p. 135-142, Tokyo, 2015.

31. ASEA AAA; DE MAIO A. A história por dentro: funções anti-inflamatória do HSF1 e das proteínas de choque térmico. In: Alexander A. A. Asea and Antonio De Maio, Protein Reviews, Volume 1: **Heat Shock Proteins: Potent mediators of inflammation and Immunity** - Edited, v.1, cap.7, Ed. Springer, 2007.
32. RAN R; LU A. Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. **Genes Dev**, v.18, n.12, p.1466-1481, jun. 2004.
33. KRAUSE M; HECK TG; BITTENCOURT A; SCOMAZZON SP; NEWSHOLME P; CURI R; DE BITTENCOURT PIH. The chaperone balance hypothesis: The importance of the Extracellular to Intracellular HSP70 Ratio (eHSP70/iHSP70) to inflammation-driven Type 2 Diabetes, the effect of exercise and the implications for clinical management, **Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation**, feb. 2015a.
34. HECK TG; SCHOLER CM; DE BITTENCOURT PIH. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? **Cell Biochem Funct**, v. 29, n. 3, p. 215-226, apr. 2011.