



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE CHOQUE TÉRMICO EM RATOS WISTAR PARA ESTUDO DA EHSP70¹

Maicon Machado Sulzbacher², Maciel de Alencar Bruxel³, Pauline Brendler Goettens⁴, Eliara Ten Caten Martins⁵, Thiago Gomes Heck⁶, Mirna Stela Ludwig⁷.

¹ Projeto de Pesquisa de Iniciação Científica

² Estagiário Rumo Certo-UNIJUI. Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

³ Aluno de Mestrado PPG-Fisiologia-UFRGS. Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

⁴ Aluna de Mestrado Ciências da Saúde-UFCSPA. Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

⁵ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

⁶ Professor do Departamento de Ciências da Vida (DCVida). Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

⁷ Professora do Departamento de Ciências da Vida (DCVida). Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

Resumo: A temperatura corporal é uma das variáveis fisiológicas mais estritamente controlada, mas que pode modificar-se significativamente por influência farmacológica, a qual, neste caso, passa a depender da temperatura do ambiente externo. Este trabalho objetiva desenvolver um protocolo experimental para estudo da HSP70, no meio extracelular (eHSP70). A amostra foi composta por 28 ratos Wistar machos com idades entre 2,5 a 3 meses, provenientes do biotério da Unijuí. Os animais foram mantidos em gaiolas semi-metabólicas, em ambiente com temperatura controlada (22 +2°C), iluminação artificial, com ciclos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, recebendo água e ração ad libitum. Estes animais foram divididos em dois grupos, grupo controle (CTRL) e grupo choque térmico (HS), que foram submetidos a um protocolo experimental de HS. O grupo HS respondeu ao experimento elevando sua temperatura corporal, fazendo um pico de temperatura atingindo os 41,3°C. Pode ser observado também aumento dos níveis de eHSP70 nos animais submetidos ao HS especialmente 6h e 12h após o choque térmico. Os resultados preliminares sugerem que este protocolo poderá ser usado para o estudo de eHSP70.

Palavras-chave: Temperatura corporal, HSP70, Proteína.

Introdução

A temperatura corporal é uma das variáveis fisiológicas mais estritamente controlada, apresentando um valor relativamente constante em condições fisiológicas, mas que pode modificar-se significativamente em situações de anormalidade metabólica e por influência farmacológica (Souza e Costa, 2005).

Neste sentido, o controle da temperatura corporal depende de fatores internos e a interação com o ambiente externo. O centro regulador da temperatura corporal localiza-se no hipotálamo, o qual estimula a termogênese (geração de calor) e a termólise (dissipação de calor). Uma grande fração de





Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

estímulos determinantes de respostas comportamentais termorreguladoras é originada nos termorreceptores periféricos, sensíveis a estímulos térmicos ambientais. Os mecanismos centrais e periféricos funcionam conjuntamente para condicionar a temperatura corporal em torno de 35,5°C à 37°C, sendo, portanto, um condicionamento normal de temperatura corporal (Douglas 2002).

O centro termorregulador hipotalâmico pode ter seu funcionamento alterado em virtude da administração de anestésicos, principalmente aqueles com característica de anestesia geral. Os efeitos destes fármacos acarretam diminuição na atividade neuronal atingindo o centro de regulação térmica, aumentando os limites de tolerância da homeostase da temperatura central corporal, a qual passa a depender da temperatura do ambiente externo (Souza e Costa, 2005).

Ao longo do processo evolutivo os organismos foram desenvolvendo mecanismos que deflagram respostas de proteção frente aos fatores estressores, também referidas como resposta celular ao estresse. Neste sentido, a temperatura em que se determina um choque térmico está na margem de uma temperatura corporal de 40 a 42°C (Horowitz, 2002; Gordon, 1993). A resposta ao choque térmico caracteriza-se pela síntese de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSP, do inglês heat shock protein).

As HSPs são encontradas nos mais diferentes compartimentos celulares e atuam como chaperonas moleculares. São expressas em estado fisiológico normal, no entanto, a síntese e concentração destas proteínas no meio intracelular (iHSPs), é intensificada pelo choque térmico. Elas desempenham papel fundamental na homeostase celular, protegendo os tecidos contra lesões, reparando proteínas danificadas, modulando a inflamação da célula, e promovendo a cicatrização do tecido lesado (Benjamin, 1998; Heck., 2011; Atalay, 2009). Entre as HSPs, destaca-se a HSP70, uma proteína de choque térmico de 70 kDa.

Quando localizada no ambiente intracelular a HSP70 apresenta funções citoprotetoras e anti-inflamatórias, porém quando exportada e circulante no plasma (eHSP70) parece apresentar função importante na resposta do sistema imune, pois nesta condição está associada a situações de estresse, incluindo inflamação, infecções bacterianas e virais, desempenhando papel pró-inflamatório (Schmitt et al., 2007; Heck, 2011). É possível mencionar que o aumento da eHSP70 pode representar um quadro pró-inflamatório pois, a concentração elevada desta proteína no ambiente extracelular pode ser um fator deflagrador de processos inflamatórios ou uma consequência de uma inflamação já estabelecida no organismo (Heck, 2011).

No entanto, ainda não está claro a relevância clínica da presença da eHSP70 no sangue. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo experimental para estudo do papel desta proteína no ambiente extracelular.

Metodologia

Animais: Foram utilizados 28 ratos Wistar machos, com idade entre 2,5 à 3 meses, provenientes do Biotério da UNIJUI – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em gaiolas semi-metabólicas, em ambiente com temperatura controlada (22 +2°C), umidade relativa do ar entre 50% e 60% e iluminação artificial com ciclos de 12/12 horas de claro/escuro. Os animais receberam ração padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1) e



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

água ad libitum. Os experimentos ocorreram no Laboratório de Ensaios Biológicos da Unijuí (LEBio) com ambiente climatizado em $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Destes animais, 04 foram utilizados para acompanhamento da temperatura corporal e 24 foram utilizados para análise da expressão de proteínas de choque térmico.

Grupos experimentais: Para avaliação da expressão das proteínas de choque térmico, os 24 animais foram divididos em grupo controle (CTRL) e grupo (HS), o qual foi submetido ao choque térmico (HS) e, posteriormente dividido nos grupos dos distintos tempos pós-HS, conforme demonstrado na tabela 1.

	Controle (CTRL)	Choque Térmico (HS)	Controle (CTRL)	Choque Térmico (HS)	Controle (CTRL)	Choque Térmico (HS)
Ratos	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4
Tempo pós-HS	6 hrs	6hrs	12 hrs	12hrs	24 hrs	24hrs

Caracterização dos grupos experimentais

Para o acompanhamento da variação da temperatura, 04 animais foram avaliados 30 minutos antes do início (Pré), durante (HS) e 30 minutos após (Pós) o banho com água a $42\pm 0,16^{\circ}\text{C}$.

Administração dos Anestésicos: Todos os animais foram anestesiados com Ketamina 10% (DOPALEN injetável – frasco com 1g ketamina base/10ml – Lab. Vetbrands) na dose de $0,02\text{mg/kg}$ e Xilazina 2% (KENSOL – cloridrato de xilazina a 2%- Lab. König), na dose de 90mg/kg , via intraperitoneal (i.p.), cerca de 5 minutos antes do início do choque térmico. Conforme Souza e Costa (2005), a anestesia reduz a eficácia de regulação da temperatura corporal dos animais, sendo assim os mesmos passam a realizar endotermia com o meio.

Protocolo de Choque Térmico: Durante todo o procedimento a temperatura corporal dos animais foi monitorada por via retal, sendo aferida com termômetro digital (Techline). Os animais do grupo HS foram colocados em um recipiente com água a uma temperatura de 42°C , ficando com o corpo (exceto cabeça e membros dianteiros) imersos na água. Após elevação da temperatura retal até 41°C os animais permaneceram nesta condição durante 15 minutos. Então foram retirados do banho, secados e protegidos com panos secos para evitar hipotermia. Os animais do grupo CTRL, depois de anestesiados, tiveram a temperatura retal aferida e foram também protegidos de hipotermia. Após a recuperação da anestesia, todos os animais receberam 3mL de solução de NaCl 0,9%, por gavagem, para evitar a desidratação.

Eutanásia e coleta de amostras: Os animais foram mortos com guilhotina nos diferentes tempos 6h, 12h e 24h após choque térmico para coleta de sangue com Heparina Sódica (HEPAMAX- heparina sódica 5000U.I./ml –Lab. Blaüsigel). As amostras de sangue foram centrifugadas em centrífuga hematológica a 3000 RPM por 5 min para coleta do plasma. As carcaças dos animais foram armazenadas em freezer, para posterior entrega ao serviço de coleta de resíduos da UNIJUI.

Dosagem de Proteínas: A concentração de proteínas no plasma foi determinada pelo método espectrofotométrico de Bradford, a 595nm , utilizando curva padrão de albumina (1mg/ml) (Bradford, 1976).



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

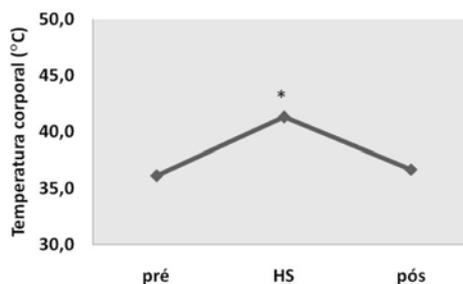
Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

Expressão de eHSP70: A expressão de eHSP70 do plasma foi avaliada em ambos os grupos experimentais por Western Blotting, eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970), com uso de anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147) (1:1000), com segundo anticorpo contendo peroxidase (Sigma A9044). Os procedimentos foram realizados com Snap-id (Millipore). A concentração de eHSP70 foi expressa em unidades arbitrárias da relação eHSP70/Albumina.

Análise Estatística: Utilizou-se o programa GraphPad 3.0. Os resultados foram expressos como médias \pm EPM, seguidos por teste t de Student para comparação das médias entre os grupos/condição, considerando nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Os animais anestesiados responderam ao protocolo de choque térmico elevando sua temperatura corporal, apresentando pico de temperatura média de 41,3°C. Transcorridos 30 minutos desde o final do choque térmico, a temperatura corpórea dos animais retornou ao valor normal conforme a figura 1.



Temperatura corporal (retal) de animais antes (pré), durante (HS) e depois (pós) do choque térmico. Dados expressos em média \pm EPM. *diferença em relação ao tempo pré e pós. $P < 0,001$

Conforme apresentado na Figura 2, a concentração de eHSP70 6h e 12h após o choque térmico encontra-se elevada se comparada com os respectivos valores dos grupos controle (CTRL), enquanto que, 24 horas após o choque térmico os níveis de HSP no plasma são semelhantes aos animais que permaneceram a temperatura ambiente.

SALÃO DO CONHECIMENTO

XX Seminário de Iniciação Científica
XVII Jornada de Pesquisa
XIII Jornada de Extensão

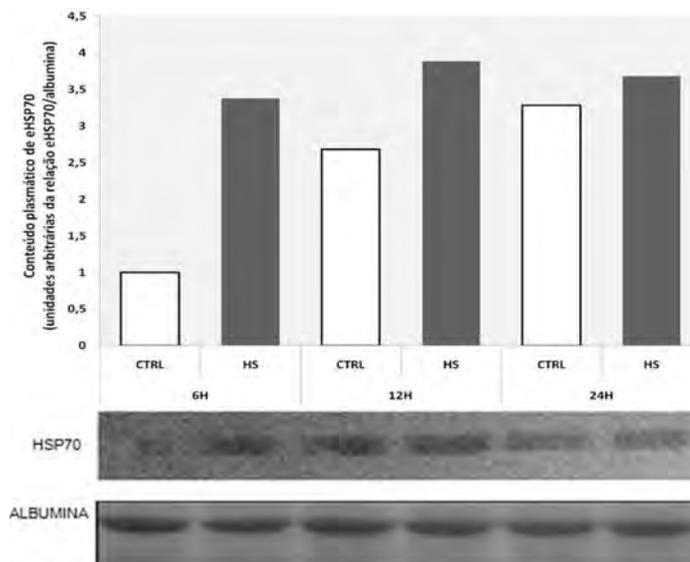
II Mostra de Iniciação Científica Júnior
II Seminário de Inovação e Tecnologia

2012



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica



Nível de eHSP70 no plasma de animais 6, 12 e 24 horas após tratamento com choque térmico

Conforme apresentado na Figura 2, a concentração de eHSP70 6h e 12h após o choque térmico encontra-se elevada se comparada com os respectivos valores dos grupos controle (CTRL), enquanto que, 24 horas após o choque térmico os níveis de HSP no plasma são semelhantes aos animais que permaneceram a temperatura ambiente.

Conclusão

Os resultados preliminares sugerem a utilização deste modelo experimental para estudos do papel da HSP70 no ambiente extracelular.

Agradecimentos

Agradeço a UNIJUI pela infra-estrutura do Laboratório de Ensaio Biológicos, ao Estágio Rumo Certo pela concessão de estágio, ao Laboratório de Fisiologia Celular (FISCEL) da UFRGS pelo apoio na aquisição de material de consumo, e especialmente aos colegas de Laboratório que auxiliaram no decorrer do procedimento, Eloísa Gabriela de Pelegrin Basso, Bethânia Salamoni, Fernanda Giesel Baldissera, Analú Bender dos Santos.

Referências

- DOUGLAS, C.R. Tratado de Fisiologia Aplicada a Saúde, ed 5., Ed Robe Editorial. São Paulo, 2002. Cap 53, p 914-926.
- GORDON, C.J. Temperature acclimation. Temperature Regulation in Laboratory Rodents. New York: Cambridge University Press. 1993. p 163-180.
- HECK, T.G. Hsp70 como Marcador de Intensidade de Exercício: Razão entre o Conteúdo Extracelular e Intracelular de Hsp70 como um Sinal de Alerta Imunológico. [Tese de Doutorado apresentada ao



Para uma VIDA de CONQUISTAS



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Movimento Humano da Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência do Movimento Humano]. Porto Alegre; 2011.

HOROWITZ, M .From molecular and cellular to integrative heat defense during exposure to chronic heat. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Physiology. 2002, v. 131, p 475–483.

SCHMITT, E.M; GEHRMANN, M; BRUNET, G; MULTHOFF AND C. GARRIDO. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. Journal of leukocyte biology. 2007 v. 81, n. 1, p,15-27.

SOUZA, V.P; COSTA, R.J.R. Medicina Perioperatória. Ed Soc. Bras. de Anestesiologia.2005.Cap 62 p 539-560.