

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

## **EFEITO DA TERAPIA DE CHOQUE TÉRMICO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE HSP70 E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE RATAS OVARIETOMIZADAS<sup>1</sup>**

**Guilherme Wildner<sup>2</sup>, Carolain Felipin Vincensi<sup>3</sup>, Yohanna Hannah Donato<sup>4</sup>, Yana Picinin Sandri Lissarassa<sup>5</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>6</sup>, Mirna Stela Ludwig<sup>7</sup>.**

<sup>1</sup> Pesquisa Institucional desenvolvida do Departamento de Ciências da Vida, pelo Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), no laboratório de Ensaios Biológicos da UNIJUI, durante o período de bolsa PROBIC/FAPERGS 2015-2016

<sup>2</sup> Acadêmico do curso de Ciências Biológicas Bacharelado, bolsista PROBIC/FAPERGS, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), UNIJUI. wildner.gw@gmail.com

<sup>3</sup> Biomédica, RT do Laboratório Escola de Biomedicina – IESA, Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde – UNIJUI/UNICRUZ, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF). carolainvincensi@gmail.com

<sup>4</sup> Acadêmica do curso de Enfermagem, bolsista PIBIC/UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), UNIJUI. yohannadonato260@gmail.com

<sup>5</sup> Biomédica, Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde – UNIJUI/UNICRUZ, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF). yanaps@hotmail.com

<sup>6</sup> Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUI. thiago.heck@unijui.edu.br

<sup>7</sup> Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUI. ludwig@unijui.edu.br

### **INTRODUÇÃO**

O estrogênio é um dos principais hormônios do organismo feminino, tendo papel regulador na função sexual e reprodução, sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-ovários (RETTEBERG; JIA; BRINTON, 2014; BATES et al., 2013). A menopausa é marcada pela redução da concentração de estrogênio circulante, especialmente estradiol (E2), em consequência da perda de função ovariana. A diminuição dos níveis de estrogênio está relacionada a alterações nas funções metabólicas e tróficas, e causa diversos sintomas que incluem fogachos, sudorese, alterações de humor e sono, além de fadiga, perda de elasticidade da pele e resistência dos ossos (SUCKLING, 2006). O estradiol, conhecido por ser o estrogênio de maior importância no organismo feminino, é um potente antioxidante, com efeito preventivo sobre a peroxidação lipídica em tecido hepático (HUH et al., 1994). Sabe-se que, em ratas, a ovariectomia acelera o ganho de massa corpórea, mais especificamente de tecido adiposo ou de proteínas (BATES; BOWLING, 2013).

Além disso, a falta do estrogênio por se associado às mudanças metabólicas ocasionadas em função do declínio de sua disponibilidade no organismo feminino, predispõe o organismo a um aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo (BETSY et al., 2009). Outro fator importante gerador de estresse celular é a lipoperoxidação, que é considerada uma das maiores fontes de lesões diretamente as membranas celulares, sendo essas lesões mediadas por radicais livres (DATTILO et al., 2015), resultando em produtos dessa reação, como o Malondialdeído (MDA). Dessa forma, o

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

organismo precisa alterar suas defesas celulares, como por exemplo, a defesa executada pelas proteínas do estresse, onde se destacam as proteínas de choque térmico de 70kDa (HSP70) (NAKHJAVANI et al., 2010).

A família HSP70, quando no ambiente intracelular, atua principalmente como chaperona molecular, ou seja, no auxílio durante dobramento de proteínas, impedindo o mau dobramento e no transporte citosólico das mesmas (ALBERTS et al., 2010), sendo assim, terapias térmicas são estudadas a fim de descobrir se podemos aumentar o conteúdo de HSP70 e combater o estresse oxidativo (EO) (KRAUSE et al., 2015).

Além da defesa das HSP, temos as enzimas Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD) como primeira linha de defesa do organismo contra o estresse oxidativo, atuando pelo combate ao EO, a fim de manter o equilíbrio redox do organismo (BARBOSA et al., 2010). Portanto, como tentativa manter o estado de homeostasia, o organismo tende a aumentar suas linhas de defesa, podendo potencializar a síntese de proteínas do estresse, acompanhadas por um aumento da atividade das enzimas antioxidantes.

Deste modo, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da terapia de choque térmico sobre expressão de HSP70 e parâmetros de estresse oxidativo hepático, em ratas ovariectomizadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Animais:** foram utilizadas neste estudo 32 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultas (20 semanas), virgens, provenientes do biotério da UNIJUI. Os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro 12h/12h, temperatura ambiente de 22±2°C e umidade relativa do ar a 60%. A alimentação consistiu em dieta comercial (NUVILAB®) e água ad libitum. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética da UNIJUI (CEUA 003/2015), de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

**Delineamento experimental:** os animais foram divididos em 4 grupos (n: 8): Controle (C): animais submetidos à falsa cirurgia e mantidos em normotermia; Terapia de térmica (TCT): animais submetidos à falsa cirurgia e terapia térmica; Ovariectomizadas (OVX): animais submetidos à intervenção cirúrgica COM remoção bilateral dos ovários e mantidos em normotermia; Ovariectomizadas + Terapia de choque térmico (OVX+TCT): animais submetidos à intervenção cirúrgica com remoção bilateral dos ovários e à terapia térmica. Ao final do estudo os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores e tiveram seus tecidos coletados para análises posteriores.

**Procedimento cirúrgico (ovarectomia):** o procedimento cirúrgico foi realizado pela médica veterinária responsável pelo Biotério da Unijuí, no bloco cirúrgico do Hospital Veterinário da Universidade. A ovariectomia (OVX) em roedores envolveu a remoção bilateral dos ovários. Os animais não ovariectomizados foram submetidos à falsa operação, onde tiveram seus ovários identificados e expostos cirurgicamente. 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 SC a cada 4h por 24 horas. 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). Após os

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram submetidos a tratamento pós-operatório apropriado composto de monitoramento da temperatura corporal e de sinais de dor.

**Terapia Térmica:** a terapia de choque térmico foi iniciada 7 dias após o procedimento cirúrgico. Todos os grupos foram anestesiados antes de cada intervenção. 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). A intervenção foi realizada com uma sessão semanal, por um período de 12 semanas. Os animais dos grupos TCT e OVX+ TCT foram colocados em 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 ele estava no banho. Ao atingirem temperatura corporal de 41 °C foi considerado o início da sessão de choque térmico, sendo mantidos no banho, com temperatura corporal entre 41 e 41,5 °C, por 15 minutos (CHUNG et al., 2008; BATHAIE et al., 2010; LUDWIG, 2013). Os grupos C e OVX foram mantidos em banho com água a 37 °C e temperatura corporal entre 36,5 e 37,5 °C. Após o período de banho, os animais foram secos, mantidos cobertos com toalhas no laboratório, com temperatura ambiente de 24 °C até 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.

**Expressão de HSP70 em tecido hepático:** a expressão de HSP70 em tecido hepático foi realizada por análises de imunoblotting (LAEMMLI, 1970).

**Dosagem de proteínas:** a concentração de proteína do tecido foi determinada pelo método espectrofotométrico proposto por Bradford, 1976.

**Teste das substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico – TBARS:** a determinação da peroxidação lipídica foi realizada pela técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE; AUST, 1978).

**Determinação do conteúdo das enzimas superóxido disutase (SOD) e catalase (CAT):** a análise da atividade de SOD foi realizada pela técnica de inibição da auto-oxidação do pirogalol (MARKLUND; MARKLUND, 1974). A atividade da Catalase (CAT) foi realizada de acordo com a descrição de Aebi (1984).

**Análise estatística:** para as análises de concentração de HSP70, concentração de MDA e atividade enzimática de SOD e CAT foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  desvio padrão (DP) e analisados por ANOVA de uma via, com teste post-hoc de TUKEY, considerando nível de significância estatística o limite de 5% ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relativos a concentração HSP70 indicam não ter havido alteração desta proteína no tecido hepático em nenhum grupo experimental (Figura 1A). Quanto aos parâmetros de estresse oxidativo, observa-se que a atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT, não se apresentam alteradas em nenhum grupo experimental, considerando as unidades de SOD/mg de proteína (Figura 1C) e unidades de CAT/mg de proteína (Figura 1D). Contudo, observa-se alteração nos níveis de MDA (mmol/L) (Figura 1B) do grupo TCT quando comparado ao grupo C.

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

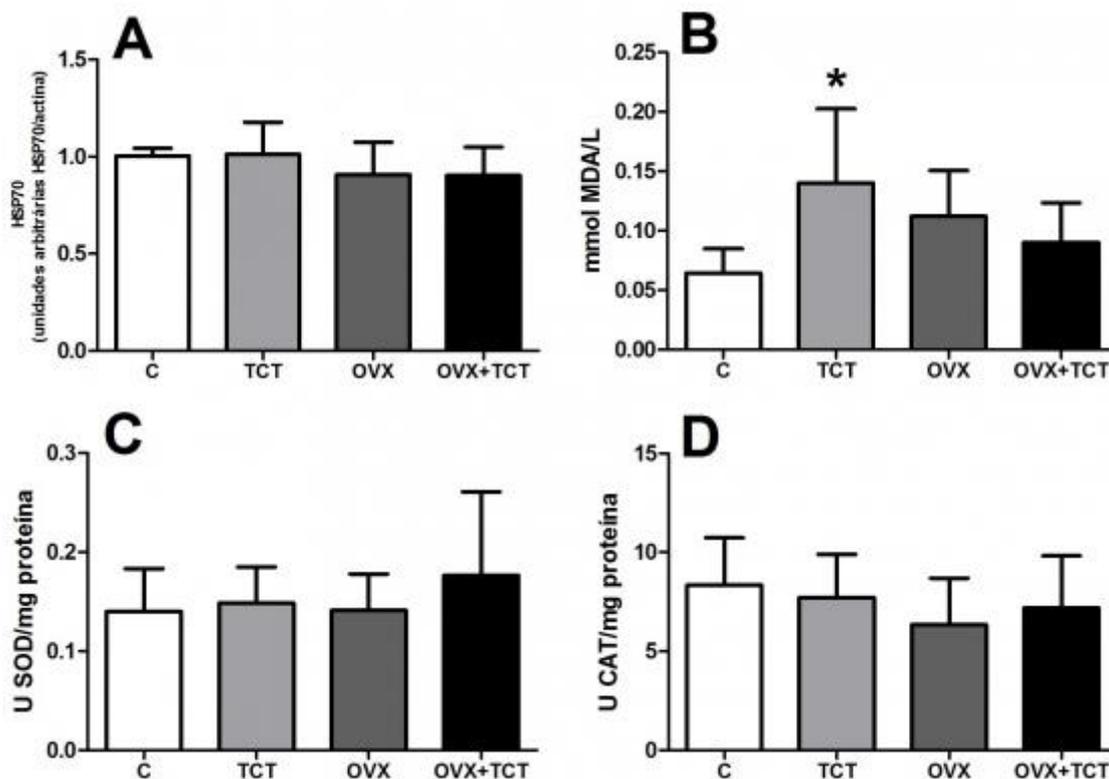


Figura 1. Avaliação de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em ratas em 12 semanas de normoterapia, tratamento de choque térmico, ovariectomia e combinação de tratamento de choque térmico e ovariectomia. Concentrações de iHSP (A), concentração de MDA (B) e atividade enzimática da SOD (C) e CAT (D) em tecido hepático. Análise estatística por Anova de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey, considerando  $P < 0,05$ . Dados expressos como média  $\pm$  DP. \* vs C para  $P = 0,0117$ .

A análise da razão entre o conteúdo de SOD e de CAT (Figura 2) nos diferentes grupos experimentais não apresentou diferença entre os grupos experimentais.

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

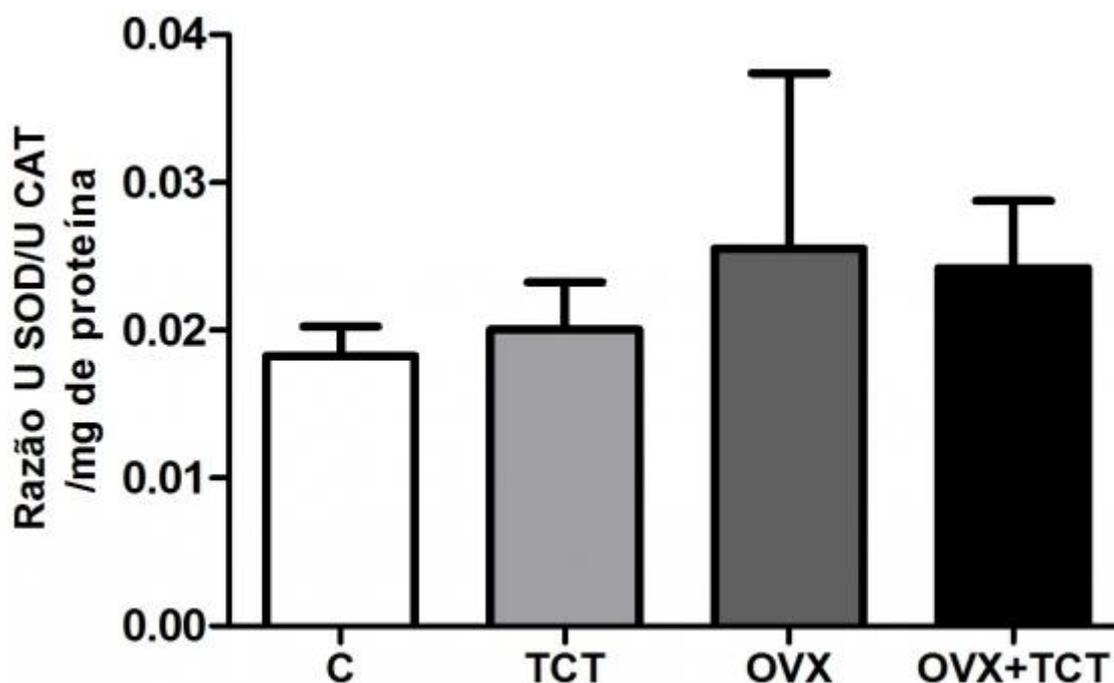


Figura 2. Avaliação da razão SOD/CAT em tecido hepático dos grupos C (A), TCT (B), OVX (C) e OVX + TCT (D). Análise estatística por ANOVA de uma vida, seguido de teste de post-hoc de Tukey, considerando significância de  $P < 0,05$  Dados expressos como média  $\pm$  DP.  $P = 0,2674$  e  $R = 0,1609$ .

A análise da correlação entre as concentrações de MDA e iHSP70, nos diferentes grupos experimentais (Figura 3), indica haver uma correlação inversa entre a concentração celular de HSP70 (iHSP70) e a concentração de MDA, ou seja, quanto maior a concentração de iHSP70, menor a concentração de MDA nos animais do grupo TCT. Observa-se neste mesmo grupo experimental (TCT), aumento na concentração de MDA, indicando maior nível de lipoperoxidação. Este resultado sugere que a terapia de choque térmico tem implicações sobre a ativação de mecanismos de defesa hepáticos contra a lipoperoxidação, envolvendo a HSP70, apesar de não ter sido observado aumento na concentração hepática desta proteína, no respectivo grupo experimental em relação aos demais.

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

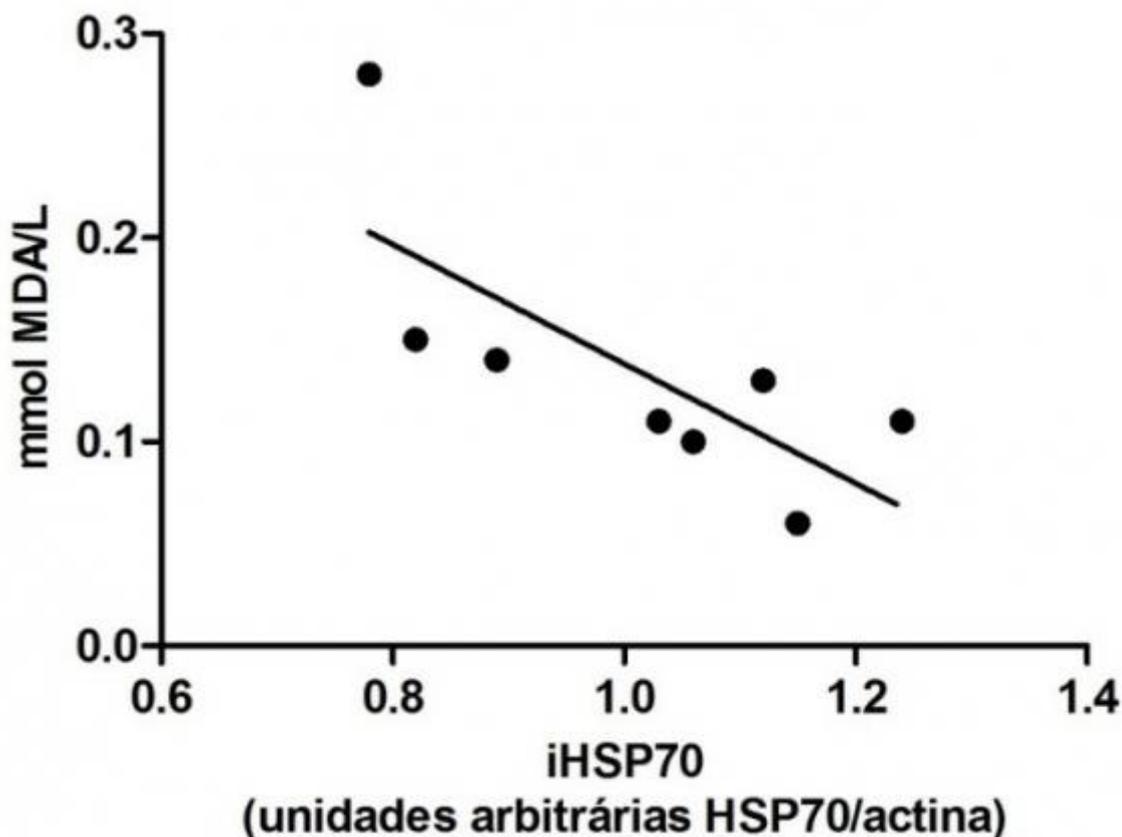


Figura 3. Avaliação da correlação entre a concentração de mmol MDA/L e concentração de iHSP em tecido hepático de animais do grupo TCT, revelando uma correlação inversa. Dados expressos como média±DP. Análise estatística por teste de correlação de Pearson, onde  $r = -0,7455$ ,  $P=0,0337$ .

Outros estudos (OKA et al., 2013) apresentam resultados similares aos obtidos em nosso trabalho, nos quais são mostrados níveis aumentados de HSP70 em fígado de ratos, 6 a 72 horas após a sessão de terapia térmica, sendo que a expressão máxima ocorreu entre 12 e 48 horas após a sessão, relacionando ao presente trabalho, encontramos relação no aumento de HSP70 hepático, ao passo que ocorre uma diminuição da concentração de MDA, propondo um caso de proteção do organismo ao estresse.

### CONCLUSÃO

Não foram observadas alterações hepáticas nos parâmetros de HSP70 e de estresse oxidativo, em razão de ovariectomia. A terapia de choque térmico pode estar associada a maior lipoperoxidação hepática, contudo, a correlação inversa entre o nível de MDA e de iHSP70 nesta condição experimental, pode representar a ativação da resposta ao estresse neste tecido.

### BIBLIOGRAFIA

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, p. 105-121, 1984.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

- BARBOSA, K. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição de Campinas*, 23(4):629-643, jul./ago., 2010.
- BATES, G. W.; BOWLING, M. Physiology and Pathology of the Female Reproductive Axis. *Periodontology*, v. 61, p. 581–661, 2013.
- 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
- 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., 1976.
- CHUNG, J.; NGUYEN, A. K.; HENSTRIDGE, D. C.; HOLMES, A. G.; CHAN, M. H.; MESA, J. L.; LANCASTER, G.I.; 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.
- DATTILO, S. et al. Heat shock proteins and hormesis in the diagnosis and treatment of neurodegenerative diseases. *Immunity & ageing*; I & A, v. 12, n. 1, p. 20, 2015.
- HUH, K. et al. Effect of sex hormones on lipid peroxidation in rat liver. *Archives of Pharmacal Research*, v. 17, n. 2, p. 109–114, 1994.
- KRAUSE, M.; LUDWIG, M. S.; HECK, T. G.; TAKAHASHI, K. Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons. Artigo submetido *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2015b (no prelo).
- 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.
- 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.
- MAYES JS, WATSON GH. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev*. 2004;5(4):197-216.
- NAKHJAVANI, M. et al. Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes. *Cell Stress and Chaperones*, v. 15, n. 6, p. 959-964, 2010.
- OKA, Y. et al. Heat-shock Pre-treatment Reduces Liver Injury and Aids Liver Recovery After Partial Hepatectomy in Mice. v. 2894, p. 2887–2894, 2013.
- 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.
- RICHARD D, ROCHON L, DESHAIES Y. Effects of exercise training on energy balance of ovariectomized rats. *Am J Physiol*. 1987;253(5 Pt 2):R740-5
- SUCKLING J, LETHABY A, KENNEDY R. Local oestrogen for vaginal atrophy in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(4):CD001500.

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