

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

EFEITO DA TERAPIA DE CHOQUE TÉRMICO SOBRE O PERFIL BIOMÉTRICO E ADIPOSIDADE EM RATAS OVARIETOMIZADAS¹

Luana Weizenmann², Yana Picinin Sandri³, Carolain Felipin Vincensi⁴, Analú Bender Dos Santos⁵, Mirna Stela Ludwig⁶, Thiago Gomes Heck⁷.

¹ Pesquisa Institucional desenvolvida no Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI

² Acadêmica do curso de Fisioterapia da UNIJUI, Bolsista de Iniciação Científica PROBIC/FAPERGS, Grupo de Pesquisa em Fisiologia – GPeF

³ Biomédica - Analista da Qualidade - Laboratório Ghanem - Joinville, Grupo de Pesquisa em Fisiologia – GPeF, Mestranda Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS) UNIJUI/UNICRUZ

⁴ Biomédica - Responsável Técnica do Laboratório Escola de Biomedicina do IESA, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Mestranda Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS) UNIJUI/UNICRUZ

⁵ Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Mestranda Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS) UNIJUI/UNICRUZ

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

⁷ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI)

INTRODUÇÃO

O climatério compreende a transição do período reprodutivo para o não reprodutivo, manifestando-se, em média, a partir de 48,7 anos (SOHENACKER et al., 2014).

O estrogênio é um hormônio esteróide, sintetizado a partir do colesterol, produzido principalmente nos ovários, sob regulação do eixo hipotálamo-hipófise. Além de ser fundamental regulador do sistema metabólico da mulher, também regula o transporte de glicose, a glicólise aeróbica e a função mitocondrial para gerar ATP, e protege contra a adiposidade, resistência à insulina e diabetes tipo II (RETTBERG, JIA, BRINTON, 2014).

A redução deste hormônio, o declínio bioenergético, (RETTBERG, JIA, BRINTON, 2014) e a ativação deficiente dos receptores de estrogênio na pós-menopausa (FORYST-LUDWIG, 2014), levam ao comprometimento do estado metabólico, acarretando em um aumento de 60% de incidência da síndrome metabólica (PARK, 1994), caracterizada por aumento da gordura intra-abdominal e do peso corporal, resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia (NAHAS et al., 2014). O aumento da gordura total e intra-abdominal é consequente da redução na oxidação de gordura, devido a diminuição do gasto energético (CAMPOREZ et al., 2013).

O declínio estrogênico possui também outras implicações, como fogachos e suores noturnos, declínio cognitivo, assim como aumento no risco de doenças como a aterosclerose, osteoporose, doença de Alzheimer, resistência à insulina e diabetes mellitus (HENDERSON, 2010).

Estudos apontam que a redução de estrogênio ocasionada pela ovariectomia, em modelos animais, favorece o aumento do colesterol total e LDL, mimetizando a pós-menopausa em humanos (BOTNER et al., 2008).

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

Medidas terapêuticas vêm sendo estudadas na perspectiva de diminuir os efeitos da falta de estrogênio durante a pós-menopausa (LORENZI et al, 2009). A terapia de choque térmico, através de sauna ou imersão em água quente, tem demonstrado efeitos benéficos no perfil metabólico, como redução de triglicerídeos, LDL, peso corporal e gordura abdominal (HOOPER et al., 2014), ainda não testado em mulheres na pós-menopausa ou em modelos animais de ovariectomia.

Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da terapia de choque térmico em ratas ovariectomizadas quanto ao perfil biométrico e a adiposidade, relacionados ao consumo de ração.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi encaminhado e submetido à Comissão de Ética para uso de Animais-CEUA, da UNIJUI. Protocolo de Pesquisa nº. 003/2015 de 13/02/2015.

Animais

Foram utilizadas neste estudo 32 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) virgens adultas com 20 semanas de idade, provenientes do biotério da UNIJUI. Mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas, controle da temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e alimentados ad libitum, com dieta comercial padrão para ratos de laboratório, NUVILAB, com livre acesso a água.

Grupos experimentais

As ratas foram alocadas em 4 grupos experimentais, sendo 8 ratas por grupo: Controle (C), Terapia de choque térmico (TCT), Ovariectomizadas (OVX) e Ovariectomizadas + Terapia de choque térmico (OVX + TCT).

Procedimento cirúrgico de ovariectomia

Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram submetidos à anestesia utilizando o seguinte protocolo farmacológico: Medicação pré-anestésica: morfina; Indução: isoflurano a 4% inalatório; Manutenção: isoflurano a 2% inalatório e Pós –operatório: morfina a cada 4h por 24 horas.

A ovariectomia (OVX) 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 (SHAM) onde tiveram seus ovários identificados e expostos cirurgicamente.

O procedimento cirúrgico foi realizado pela médica veterinária responsável pelo Biotério da Unijuí, no bloco cirúrgico do hospital veterinário. 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.

Terapia de choque térmico

A terapia de choque térmico foi iniciada 7 dias após o procedimento cirúrgico. Os animais dos grupos experimentais com terapia térmica (TCT e TCT+OVX) foram submetidos à terapia de choque térmico em sessões semanais (1x/semana), por 12 semanas. Em cada sessão, os animais foram anestesiados com xilazina 10 mg.kg⁻¹ (0,05 mL de xilazina 2%/100 g de peso) e cetamina 90 mg.kg⁻¹ i.p. (0,09 mL de cetamina 10%/100 g de peso) para supressão do controle da temperatura. A indução da hipertermia foi feita por imersão corporal (exceto cabeça e membros anteriores) em água a 42 °C (monitoramento contínuo), durante quinze 15 minutos. A temperatura dos animais foi monitorada com termômetro retal durante todo o período de banho ficando entre 41,0 e 41,5 °C (BATHAIE et al., 2010; CHUNG et al., 2008). Os animais dos grupos não submetidos ao choque térmico (C e OVX) também foram anestesiados, porém mantidos em banho com água de 37 °C e

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

temperatura corporal entre 36,5 e 37,5 °C, monitorada com termômetro retal. Após cada sessão de banho, os animais permaneceram no laboratório, mantido na temperatura ambiente de 22-24 °C, até recuperação da anestesia e, em seguida, foram levados ao biotério. Na 12ª semana os animais foram mortos para análise de materiais biológicos.

Consumo de água, de ração e 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] (GOETTEM-S-FIORIN, 2013).

O perfil biométrico dos animais foi monitorado antes de qualquer intervenção, na 6ª e na 12ª semana de terapia de choque térmico.

Os tecidos estudados (tecido adiposo branco abdominal, muscular esquelético- sóleo e gastrocnêmio- e hepático) foram coletados integralmente e pesados imediatamente após a coleta, para estabelecimento da relação entre o peso dos tecidos em relação ao peso corporal total, em termos percentuais.

Análise Estatística

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de 12 semanas as ratas foram alimentadas ad libitum, com dieta comercial padrão para ratos de laboratório, NUVILAB, contendo aproximadamente 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos e com livre acesso a água. Não houve alteração no consumo de ração (Figura 1A) e na adiposidade (Figura 1B) em decorrência da ovariectomia (OVX), da terapia de choque térmico (TCT) ou da combinação destes fatores (OVX+TCT), quando comparados ao grupo controle (C).

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

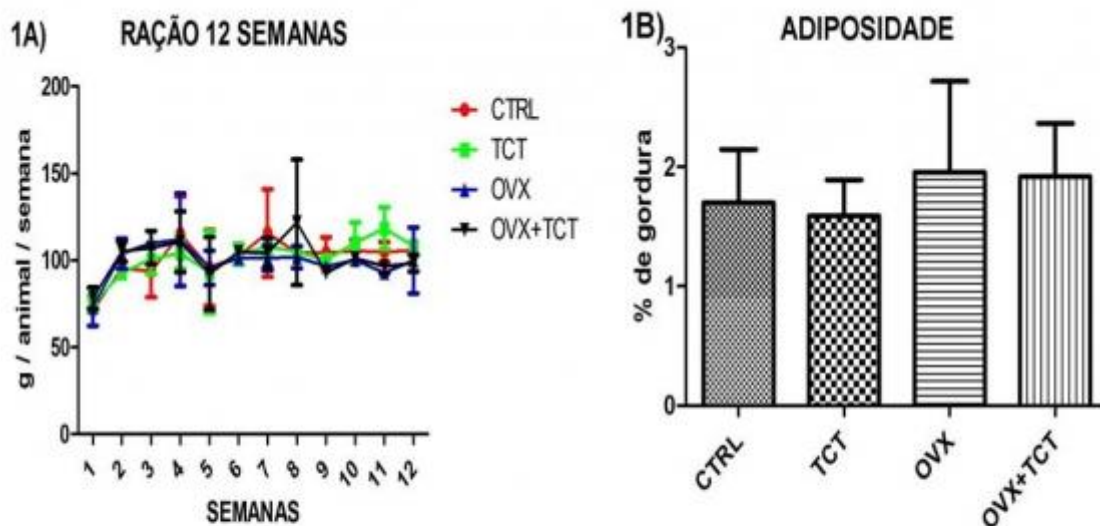


Figura 1- consumo de dieta e adiposidade de ratas submetidas a ovariectomia e a terapia de choque térmico durante 12 semanas. A) Consumo $P=0,752$. B) Adiposidade $P=0,497$. Os valores foram expressos em média + DP. C, Controle (n=7), TCT, Terapia de Choque Térmico (n=9), OVX, Ovariectomizadas (n=9), OVX+TCT, Ovariectomizadas + Terapia de choque térmico (n=7). Análise estatística por Anova de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey.

Ao analisar os grupos experimentais quanto ao ganho de peso, o grupo OVX apresentou aumento de peso maior do que os demais grupos ao longo do tempo e ao final do experimento (Figura 2A e 2B). No entanto, não foi observado diferença entre os grupos quanto ao índice de massa corporal (IMC) dos animais (Figura 2C).

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

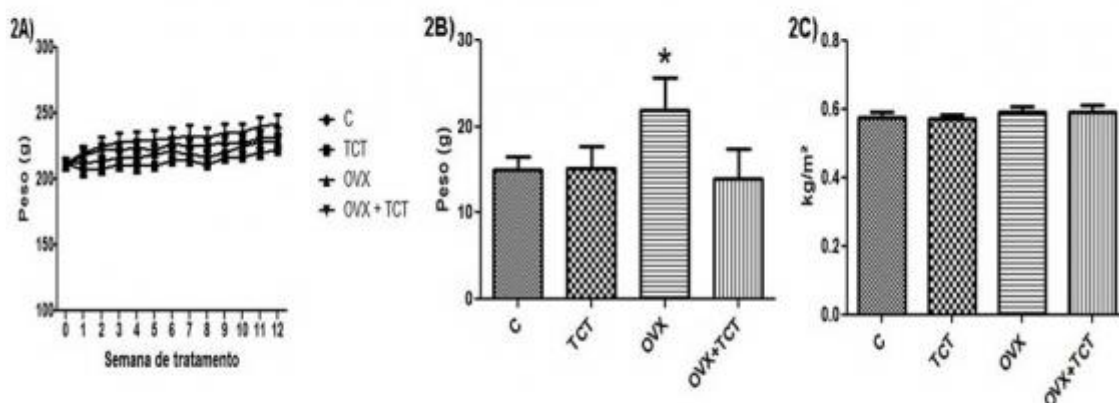


Figura 2- Peso corporal e IMC de ratas ovariectomizadas submetidas a terapia de choque térmico ao longo de 12 semanas. Os valores foram expressos em média + DP. C, Controle (n=7), TCT, Terapia de Choque Térmico (n=9), OVX, Ovariectomizadas (n=9), OVX+TCT, Ovariectomizadas + Terapia de choque térmico (n=7). Análise estatística por Anova de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey. A). Ganho de peso ao longo do tempo $P < 0,05$ C vs OVX. B). Peso final $P = 0,2298$, C) IMC $P = 0,6916$.

De acordo com os resultados apresentados neste estudo, podemos sugerir que há indicativos de uma relação entre a privação do hormônio estrogênio com o aumento do peso corporal. Camporez e colaboradores demonstraram que ratas ovariectomizadas apresentaram redução no consumo de O_2 e de gasto de energia, comparadas a ovariectomizadas tratadas com estradiol e ao grupo controle, levando a um ganho de peso associado com aumento da massa de gordura. Sugerindo que o aumento do peso corporal poderia ser explicado pela redução do gasto energético em mulheres na pós-menopausa (CAMPOREZ, et al., 2013).

A terapia de choque térmica aqui proposta foi capaz de evitar maior ganho de peso das ratas ovariectomizadas. A literatura indica que a terapia térmica pode ser uma estratégia útil no combate a distúrbios metabólicos como o diabetes mellitus tipo II (Krause et al, 2015). Em ratas recém ovariectomizadas, uma sessão de terapia térmica se mostrou segura quanto a parâmetros hematológicos e moleculares (Miragem et al, 2015). Portanto, este estudo complementa estudos anteriores trazendo dados da terapia térmica a longo prazo na ausência de estrogênio.

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

CONCLUSÃO

Os dados resultantes deste trabalho sugerem que a redução dos níveis estrogênicos durante a menopausa/ovariectomia estão relacionados ao aumento do peso corporal. Por outro lado, a terapia de choque térmico evitou o ganho de peso de ratas ovariectomizadas, indicando ser uma possível estratégia para mulheres na menopausa. PALAVRAS-CHAVE: terapia de choque térmico; estrogênio; ovariectomia; adiposidade; peso corporal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- 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
- FORYST-LUDWIG, A. Obesity-related cardiovascular and metabolic diseases: the role of estrogens, estrogen receptors and PPARgamma. Department of Medicine - Charité - University Medicine Berlin, 2014.
- HEINE, P. A.; TAYLOR, J. A.; IWAMOTO, G. A.; LUBAHN, D. B.; COOKE, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proc Natl Acad Sci*, v. 97, n. 23, USA, 2000.
- HENDERSON, V. W. Action of estrogens in aging brain: dementia and cognitive aging. *Biochem Biophys Acta*, n. 10, p. 1077-1083, 2010.
- 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
- 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*, 2015
- 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.
- 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.
- MIRAGEM, ANTÔNIO AZAMBUJA; LUDWIG, MIRNA STELA ; HECK, THIAGO GOMES ; BALDISSERA, FERNANDA GIESEL ; DOS SANTOS, ANALU BENDER ; FRIZZO, MATIAS NUNES ; HOMEM DE BITTENCOURT, PAULO IVO . Estrogen deprivation does not affect

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

vascular heat shock response in female rats: a comparison with oxidative stress markers. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 405, p. 1-13, 2015

PARK YW, ZHU S, PALANIAPPAN L, HESHKA S, CARNETHON MR, HEYMSFIELD SB
2003 The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994.

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.

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.

World Health Organization. Research on the Menopause. Geneva: WHO; 1981. [Technical Report Series, p. 670].