

## **O IMPACTO DA TERAPIA TÉRMICA E DO EXERCÍCIO FÍSICO NO ESTRESSE OXIDATIVO E NA CONCENTRAÇÕES DE HSP70 NO TECIDO MUSCULAR DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À INDUÇÃO DE OBESIDADE<sup>1</sup>**

**Eduarda Marques de Brum<sup>2</sup>, Amanda Gularte Gomes<sup>3</sup>, Luana Weizenmann<sup>4</sup>, Renan Daniel Bueno Basso<sup>5</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>6</sup>, Matias Nunes Frizzo<sup>7</sup>**

<sup>1</sup> Projeto de pesquisa desenvolvido na Unijuí, através do Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF- com apoio CNPQ/FAPERGS.

<sup>2</sup> Bolsista de Iniciação Científica CNPq/FAPERGS pelo Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF- da Unijuí; estudante do curso de Medicina pela Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - Unijuí;

<sup>3</sup> Bolsista de Iniciação Tecnológica CNPq pelo Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF- da Unijuí; estudante do curso de Medicina pela Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - Unijuí;

<sup>4</sup> Aluna de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUÍ);

<sup>5</sup> Aluno de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUÍ);

<sup>6</sup> Professor Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUÍ) e Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional (PPGMMC);

<sup>7</sup> Professor do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUÍ).

### **INTRODUÇÃO**

Segundo a Organização Mundial da Saúde, 2,3 bilhões de adultos em 2025 estarão acima do peso, e destes, 700 milhões com algum grau de obesidade (Abeso, 2023). A partir dessa visão é necessário refletir sobre a necessidade de investigarmos formas de tratamento não farmacológicas visando minimizar os agravos e comorbidades desta condição sucessivamente mais prevalente mundialmente.

O distúrbio da obesidade eleva o metabolismo celular promovendo um aumento na atividade da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, resultando em aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e do estresse oxidativo. Estes, alteram a expressão de proteínas de choque térmico, os quais contribuem para o comprometimento da sinalização e metabolização da glicose circulante (Karczewski et al., 2018). Esse quadro ocasiona a persistência de altos níveis de glicemia, caracterizando a hiperglicemia crônica da doença Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) (White et al., 2013).

Através deste espectro, alternativas como o exercício e a terapia térmica se mostram como tentativas de modificação frente ao comprometimento metabólico, sistêmico e funcional de um organismo. Nesse viés, o exercício físico trata-se de uma intervenção não farmacológica capaz de aumentar a captação de glicose, auxiliar na diminuição de tecido adiposo e consequentemente do quadro inflamatório (Hawley et al., 2008), além de induzir proteínas e miocinas que colaboram com a atenuação da inflamação sistêmica gerada pela obesidade (Eckel, 2019), como as proteínas de choque térmico (HSPs) (Heck; Scholer; De Bittencourt, 2011). De maneira similar, a terapia térmica também mostra-se como uma



alternativa capaz de reduzir a inflamação (Krause et al., 2015) e aumentar a síntese de HSP70 (Morimoto, 1988), com ação anti-inflamatória e anti-apoptótica intracelular (iHSP70) (Castro et al., 2013) e ação pró-inflamatória no ambiente extracelular (eHSP70) (Rodrigues-Krause et al., 2012) como efeito da hipertermia.

O efeito anti-inflamatório da HSP70 é associado à sua capacidade de interação com o NF- $\kappa$ B, uma vez que a HSP70 associa-se com o complexo NF- $\kappa$ B e seu inibidor, estabilizando-o e impedindo a sua translocação para o núcleo (Newsholme et al., 2014b). No entanto, essas características anti inflamatórias, antioxidante e anti apoptótica se dão quando a HSP70 está no meio intracelular, sendo oposto quando em meio extracelular, podendo decorrer de situações crônicas e maléficas para o organismo. Desta forma, o controle dos fatores de transcrição inflamatórios é fundamental para melhora da sinalização insulínica e controle glicêmico (Newsholme et al., 2014a). Logo, o aumento de HSPs induzido por terapia térmica de calor ou pelo exercício físico, torna o indivíduo menos propenso a hiperglicemias, hiperinsulinemias, intolerância à glicose e resistência insulínica (Hooper, 1999).

Dessa forma, o presente projeto busca avaliar a concentração de HSP70 e o estado redox, no músculo gastrocnêmio, após as intervenções de treinamento físico e terapia térmica em animais submetidos à indução de obesidade.

## **METODOLOGIA**

Foram utilizados 16 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com cerca de 90 dias, provenientes do Biotério da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ). Os animais foram mantidos em gaiolas, em ambiente com temperatura controlada ( $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclos de claro/escuro de 12 horas e água potável *ad libidum*. Foram respeitados os princípios éticos estabelecidos pela diretriz brasileira para o cuidado e utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica (DBCA, 2016), sendo o presente estudo aprovado pela CEUA-UNIJUÍ protocolo 008/2021.

Inicialmente, os animais foram divididos em 2 grupos: animais que receberam dieta padrão (Controle,  $n = 4$ ) e animais que receberam dieta hiperlipídica (DHL,  $n = 12$ ) durante 12 semanas. Na semana seguinte, os animais do grupo DHL continuaram consumindo a ração hiperlipídica e foram subdivididos em dois grupos: Dieta (D,  $n=4$ ), mantido sem intervenção, Dieta+Terapia Térmica (DTT,  $n=4$ ), submetido a terapia térmica 5x/semana e Dieta+Exercício (DEX,  $n=4$ ), submetidos ao treinamento físico 5x/semana. As dietas dos

animais foram a ração comercial padrão (4% gordura) para o grupo controle e para os grupos dieta utilizamos a Dieta Hiperlipídica (60% de gordura).

As intervenções realizadas a partir da 13<sup>a</sup> semana foram: o exercício físico, sendo os animais submetidos a 20 minutos de atividade física, 5 vezes na semana, realizada na esteira, com velocidade de 16 m/minuto, correspondendo a um exercício moderado; terapia térmica de calor, sendo os animais alocados individualmente em um recipiente (30cm<sup>3</sup>), submersos ~80% do corpo em água de um banho-maria a 42°C, sendo mantidos por 15 minutos.

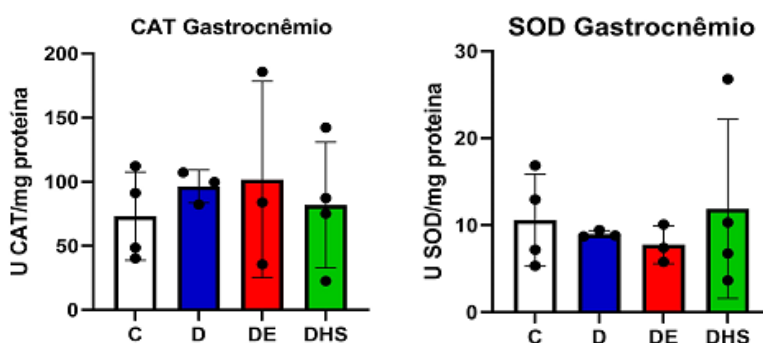
Após 22 semanas, foi realizada a eutanásia e coleta de plasma e tecidos para análises laboratoriais. Foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) por espectrofotometria cinética a 420 e 240nm, respectivamente. Já para as análises de HSP intracelular, após a homogeneização eletroforese e eletrotransferência, foi realizada imunodeteção com anticorpo monoclonal anti-HSP70 (H5147 Sigma, 1:1000) e segundo anticorpo (A9044 Sigma, 1:15000), e normalizado pela expressão de  $\beta$ -actina (A3854 Sigma). a eHSP72 plasmática foi mensurada com Kit de ELISA (ADI-EKS-715, Enzo Life Sciences).

Os dados obtidos foram analisados pelo Teste de Normalidade por Kolmogorov-Smirnov, e analisados por ANOVA de uma via seguido de teste post-hoc de Tukey ( $p < 0.05$ ) (SPSS V.18). Correlações foram avaliadas pelo teste de Pearson ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nossos resultados observamos que o consumo de DHL, assim como o exercício físico e a terapia térmica não foram capazes de alterar as atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT no músculo gastrocnêmio dos animais.

**Figura I - Estresse oxidativo pela atividade enzimática CAT e SOD.**

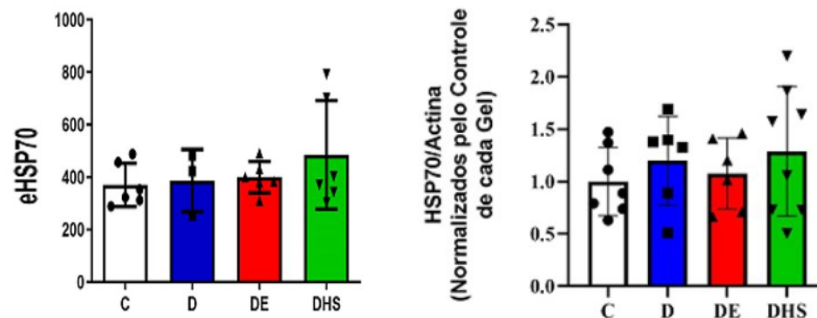


**Figura 1:** Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Foi realizado o ANOVA de uma via seguido

de teste post-hoc de Tukey. Não houve diferença entre os grupos. Fonte: Próprios autores

Também identificamos que não houve alteração na concentração de HSP70 plasmática e HSP70 intracelular no músculo gastrocnêmio.

**Figura II - Concentração de HSP70**



**Figura 2:** eHSP70 - dados referente às concentrações de HSP70 no plasma. iHSP70 - dados referente às concentrações de HSP70 no músculo gastrocnêmio. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Foi realizado o ANOVA de uma via seguido de teste post-hoc de Tukey. Não houve diferença entre os grupos. Fonte: Próprios autores

O grupo Dieta+Exercício se sobressaiu na atividade da enzima CAT e o grupo Dieta e Terapia térmica quanto a atividade da enzima SOD e expressão de HSP70 no plasma e no músculo gastrocnêmio dos animais, mas sem diferença estatística entre os grupos. A expressão de HSP70 se deve a hipertermia produzida pela terapia térmica, capaz de reduzir a inflamação (Morimoto, 1988), possuindo ação anti-inflamatória e anti-apoptótica intracelular (iHSP70) (Castro et al., 2013) e ação pró-inflamatória no ambiente extracelular (eHSP70) (Rodrigues-Krause et al., 2012).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Percebe-se que o exercício físico e a terapia térmica não foram capazes de modificar a concentração das proteínas de choque térmico ou produzir atenuação no estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio.

**Palavras-chave:** Obesidade. Winstar. Intervenções.

## AGRADECIMENTOS

CNPq, FAPERGS, CAPES, UNIJUÍ, PPGAIS e GPeF.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica.
- CASTRO, Simone Vieira et al. Proteínas de choque térmico HSP70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 7, n. 4, p.261-271, 2013.
- ECKEL, J. Myokines in metabolic homeostasis and diabetes. *Diabetologia*, v. 62, n. 9, p. 1523–1528, 2019.
- FRANCISQUETI, Fabiane Valentini; DO NASCIMENTO, André Ferreira; CORRÊA, Camila Renata. Obesity, inflammation and metabolic complications. *Nutrire*, v.40, n.1, p.81-89, 2015.
- GOODARZI, Mark O. Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, v.6, n.3, p. 223-236, 2018
- HAWLEY, John Alan; LESSARD, S. J. Exercise training-induced improvements in insulin action. *Acta physiologica*, v. 192, n. 1, p. 127-135, 2008.
- HECK, T. G.; SCHÖLER, C. M.; DE BITTENCOURT, P. I. H. HSP70 expression: Does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochemistry and Function*, v. 29, n. 3, p. 215–226, 2011.
- HOOPER, Philip L.. Hot-Tub Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus. *New England Journal Of Medicine*, v. 341, n. 12, p.924-925, 1999
- KARCZEWSKI, J. et al. Obesity and inflammation. *European Cytokine Network*, v. 29, n. 3, p. 83–94, 2018.
- KRAUSE, Mauricio; LUDWIG, Mirna S.; HECK, Thiago Gomes; TAKAHASHI, Hilton Kenji. Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes. *Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care*, v. 18, n. 4, p.374-380, 2015.
- KRAUSE, Mauricio; LUDWIG, Mirna S.; HECK, Thiago Gomes; TAKAHASHI, Hilton Kenji. Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes. *Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care*, v. 18, n. 4, p.374-380, 2015.
- MAYORAL, Laura Perez-Campos. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *Indian Journal of Medical Resarch*, v.151, n.1, p.11–21, 2020.
- MORIMOTO, Richard I.; SANTORO, M.gabriella. Stress-inducible responses and heat shock proteins: New pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature Biotechnology*, v. 16, n. 9, p.833-838, 1998.
- NEWSHOLME, Philip; KRAUSE, Mauricio. Diet, obesity, and reactive oxygen species: implications for diabetes and aging. *Systems Biology Free Radicals and Antioxidants*, 01, p. 3361–3374, 2014. (B)
- RODRIGUES-KRAUSE, Josianne et al. Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter?. *Cell Stress And Chaperones*, v. 17, n. 3, p.293-302, 2012.
- WHITE, Pollyanna A. S.;BRITO, Luciana C. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. *Arquivos Brasileiros Endocrinologia Metabologia*, v. 57, n.5, p.339-345, 2013.