

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

EFEITO AGUDO DO TRATAMENTO TÉRMICO NOS NÍVEIS DE HSP70 E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DE RATAS WISTAR¹

Antônio Azambuja Miragem², Fernanda Baldissera³, Analú Bender Dos Santos⁴, Mirna Stela Ludwig⁵, Thiago Gomes Heck⁶.

¹ Projeto de pesquisa realizado no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da UFRGS

² Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha, Santa Rosa, RS, Brasil. Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), UNIJUI, Ijuí, RS, Brasil. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Dpto de Ciências da Vida, UNIJUI.

⁴ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Dpto de Ciências da Vida, UNIJUI. Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS-UNIJUI/UNICRUZ), Ijuí, RS, Brasil.

⁵ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Dpto de Ciências da Vida, UNIJUI. Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS-UNIJUI/UNICRUZ), Ijuí, RS, Brasil.

⁶ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Dpto de Ciências da Vida, UNIJUI. Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS-UNIJUI/UNICRUZ), Ijuí, RS, Brasil.

INTRODUÇÃO

O principal hormônio estrogênio biologicamente ativo, o 17beta-estradiol (E2) elenca entre suas características as propriedades antioxidantes e vasodilatadoras. Considerado um hormônio pleiotrópico, desempenha papel metabólico fundamental em todos os sistemas do organismo, incluindo o tecido adiposo, muscular, esquelético, nervoso e cardiovascular (Kim et al., 2014). Embora, alguns efeitos dos estrogênios sejam amplamente conhecidos, a relação entre o hormônio, outras biomoléculas (possíveis biomarcadores) e diferentes vias de sinalização celulares (e possíveis interação) seguem desconhecidas.

O estradiol regula a produção de outras biomoléculas vaso ativas como as prostaglandinas (Sobrinho et al., 2010) e proteínas de estresse (ou Proteínas de Choque Térmico – do inglês, Heat Shock Protein – HSP) (Hamilton et al., 2004; Stice et al., 2011) Estes elementos bioativos tem sua fisiologia (atividade e/ou expressão) alterados durante o processo de desenvolvimento de doenças cardiometabólicas, como o diabetes, hipertensão e na síndrome metabólica.. Estudos demonstram que o estrogênio confere citoproteção cardiovascular através de regulação positiva (aumento na expressão intracelular) de diferentes proteínas de choque térmico (HSPs), em especial a iHSP70 (proteína HSP de 70kDa intracelular) (Wick et al., 2014), reforçando a forte relação entre o estrogênio e a resposta ao estresse. Este aumento na expressão iHSP70 é induzido via fator de transcrição (heat shock fator 1- HSF1), e será responsável pela defesa da célula contra um estresse proteotóxico, buscando reestabelecer a proteostase (homeostase proteica), conferindo, então citoproteção (Anckar e Sistonen, 2011)

No entanto, não há evidência sobre os efeitos de E2 sobre a HSR ou sobre a via bioquímica da HSP70 em si. Isso nos levou a investigar se a HSR pode ser preservada na ausência de E2 no tecido cardiovascular, em especial no arco aórtico, e de que maneira a castração seria capaz de interferir na

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

expressão de HSP70 induzida por tratamento térmico em ratas Wistar. Além disso, sabemos que a ativação de HSF1 redox-regulada é altamente conservada, devido a presença das cisteínas C35 e C105 (Ahn e Thiele, 2003). Deste modo, questionamos neste trabalho se qualquer alteração na HSR, induzida pela ausência do estrogênio pode ser relacionadas com alterações plasmáticas nas enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo.

METODOLOGIA

Foi realizado um estudo in vivo, experimental e prospectivo. Foram utilizadas neste estudo, ratas Wistar (28 semanas), n=25, pesando em média 250 g à 300 g (CREAL/ICBS/UFRGS). Foram mantidos em condições constantes de temperatura (24 +- 1 °C), em fotoperíodo (12h/12h claro-escuro). Comida (Nuvilab®, Curitiba, Brasil) e água ad libitum. Os grupos foram submetidos a choque térmico (Heat Shock - HS) (Toslon; Roberts, 2005) ou ovariectomia (OVX) (Zou, 2011) ou a soma das intervenções (OVX + HS). As castrações (OVX) foram realizados sob anestesia geral (Ketamina – Vetanarcol, 100 mg/kg e Xilazina – Kensol, 5 mg/kg). Os demais grupos, sem OVX, foram submetidos à falsa operação (sham operation) para padronização do estresse cirúrgico nos resultados obtidos. O grupo G1 (C) e G3 (OVX), foram mantidos em banho de imersão com a temperatura corporal controlada em 37°C (temperatura basal em repouso). Os grupos G2 (HS) e G4 (OVX + HS) foram submetidos ao protocolo de choque térmico com a temperatura da água controlada em 42 °C, para que fosse mantida a temperatura corporal em 41,2 °C durante 15 minutos. Os animais foram mortos 12 horas após a sessão de choque térmico, com o uso de guilhotina especial para roedores, a fim de coletar os tecidos para análises bioquímicas. No tecido foco do estudo (arco aórtico), foi analisada a expressão de HSP70 em homogeneizados de aorta por Western Blotting, eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970), com o uso de anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147). No sangue foi realizada a dosagem do conteúdo de eHSP70 (ADI-EKS-715, Enzo LifeScience). A concentração de proteína e determinação da peroxidação lipídica por Bradford (1976) e curva padrão de malondialdeído (MDA - 1.1.3.3 - Tetramethoxypropane) (Buege e Aust, 1978). A análise da atividade de superóxido desmutase (SOD) foi realizada técnica de inibição da auto-oxidação do pyrogallol (Marklund e Marklund 1974). A atividade da Catalase (CAT) foi realizada de acordo com o descrito por Aebi (1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostrado na Figura 1, 12 h após a sessão de choque térmico, a expressão de HSP70 no arco aórtico dos animais do grupo controle (C) foi aumentada em aproximadamente 15% (p <0,05). No entanto, não houve diferença entre o conteúdo de HSP70 em aortas de ambas as ratas, OVX e suas homólogas do C. Por outro lado, os animais OVX foram ainda capazes de apresentar uma resposta robusta ao choque térmico (HS) (HSP70 aumentada em 40%, p <0,01), o que sugere que, embora os estrogênios sejam reguladores térmicos hipotalâmicos, controlando a zona termo neutra (Dacks e Rance, 2010), a privação de estrogênio, via castração, não alterou a capacidade do tecido aórtico em responder ao tratamento térmico, aumentando a expressão de HSP70 induzidas por calor. Em outras palavras, a HSR parece estar preservado, mesmo na ausência do estrogênio.

Recentes evidência experimentais de nosso grupo, bem como por outros estudos sustentam a hipótese de que a relação entre HSP70 no plasma (eHSP70) e no tecido, HSP70 intracelular (iHSP70), pode ser um efetivo preditor do status imunoinflamatório, especialmente em doenças

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

inflamatórias crônicas (Krause et al., 2015a). De facto, as alterações na magnitude da razão $R = [eHSP70] / [iHSP70]$ emergem como um potencial novo biomarcador para a inflamação, e como um indicador muito sensível deste status inflamatório (Krause et al., 2015b).

Por isso, nos perguntamos se a OVX poderia afetar a razão HSP70 sob condições controle e/ou estimulada pelo calor. O tratamento térmico induziu o aumento esperado no conteúdo iHSP70 aórtica (examinado após 12 h), nos grupos HS e HS+OVX ($p = 0,0324$), enquanto não foi observada alteração na eHSP70 circulante. Assim, nenhuma mudança significativa na relação $[eHSP70]/[iHSP70]$ foi evidenciada. Isto significa que a curto prazo, a OVX não interferiu no status imunoinflamatório dos animais, enquanto a atividade das enzimas antioxidantes no plasma e TBARS, ficaram inalteradas. Isto pode explicar, pelo menos parcialmente, por que a HSR, que é dependente da integridade do estado redox intracelular (Ahn e Thiele, 2003), foi mantida após a redução de estrogênio. Portanto, embora a deficiência de estrogênio a longo prazo esteja associada com o estresse oxidativo e disfunção endotelial (Wassmann et al., 2001), este parece não ser o caso neste período de observação de curto prazo (7 dias).

Todos os resultados acima foram até agora inesperado, pois supomos que a depleção de estrogênio poderia interferir nas respostas teciduais agudas ao choque térmico, uma vez que os estrogênios estão envolvidos na expressão fisiológica de HSP70 em ambas as situações normais e de estresse (Hamilton et al., 2004a; Hamilton et al., 2004b). Isto é muito interessante, porque a ausência de estrogênio (pelo menos, a longo prazo) é conhecida por induzir perda óssea em roedores devido a uma resposta inflamatória exacerbada, por aumentar a função das células T e a produção de TNF- α (Cenci et al., 2000).

Contudo, os resultados sugerem que a HSR ainda é preservada após o início da privação de estrogênio e isso não foi acompanhado por nenhuma alteração em uma característica fisiológica importante do animal, o estado redox. Isto é digno de nota porque a reduzida expressão HSP70 em doenças inflamatórias crônicas está correlacionada com a piora do diabetes em pacientes obesos (Rodrigues-Krause et al., 2012), com a gravidade da doença hepática gordurosa não alcoólica em seres humanos (Di Naso et al, 2015) e a disseminação da inflamação por todo o corpo (Newsholme e Homem de Bittencourt, 2014). Portanto, é plausível supor que, após a queda inicial de concentrações de estrogênio, deve haver um intervalo de tempo no qual a HSR torna-se ameaçada, levando a muitas disfunções fisiológicas, como as que acompanham a menopausa, por exemplo, os sintomas vaso motores, em especial os fogachos. E assim, a avaliação periódica do status de HSP70 (iHSP70 vs eHSP70) pode ser de relevância clínica, pois a diminuição da capacidade de resposta HS está no centro do aparecimento de disfunções relacionadas com a menopausa.

CONCLUSÃO

A sessão de choque térmico proposta neste estudo foi capaz de induzir a expressão de iHSP70, o que sugere não serem os estrogênios os responsáveis diretos pela queda da responsividade do organismo, com o envelhecimento natural, ao choque térmico. Assim, concluímos que o efeito agudo de uma sessão de choque térmico, em ratas Wistar ovariectomizadas com idade reprodutiva avançada é capaz de induzir iHSP70 nos vasos, em especial, o arco aórtico. E isso, sendo um efeito independente da privação hormonal ovariana, incapaz de provocar alterações secundárias, em nível

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

metabólico, ao menos no que se refere ao estado redox, levando a uma resposta anti-inflamatória centrada na HSP70.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121.
- Ahn SG, Thiele DJ (2003) Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev* 17:516-528.
- Anckar J, Sistonen L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:1089-115. doi: 10.1146/annurev-biochem-060809-095203
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Buege JA, Aust, SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-309.
- Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R (2000) Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest* 106:1229-1237.
- Dacks PA, Rance NE. Effects of estradiol on the thermoneutral zone and core temperature in ovariectomized rats. *Endocrinology.* 2010 Mar;151(3):1187-93. doi: 10.1210/en.2009-1112.
- Di Naso FC, Porto RR, Fillmann HS, Maggioni L, Padoin AV, Ramos RJ, Mottin CC, Bittencourt A, Marroni NA, Homem de Bittencourt PI Jr. (2015) Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression. *Obesity (Silver Spring)* 23:120-129. doi: 10.1002/oby.20919
- Hamilton KL, Gupta S, Knowlton AA (2004a) Estrogen and regulation of heat shock protein expression in female cardiomyocytes: cross-talk with NF kappa B signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2004 36(4):577-84.
- Kim JH, Cho HT, Kim YJ. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. *Endocr J.* 2014; 61(11):1055-67.
- Krause MS, Bock PM, Takahashi HK, Homem de Bittencourt PI Jr., Newsholme P (2015) The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes. *Clin Sci* doi: 10.1042/CS20140695
- Krause MS, Heck TG, Bittencourt A., Scomazzon SP, Newsholme P, Curi R, Homem de Bittencourt PI Jr. (2015) 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. *Mediat Inflamm* 2015:249205. doi: 10.1155/2015/249205. Epub 2015 Feb 12.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- Marklund S, Marklung G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47:469-474.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

Newsholme P and Homem de Bittencourt PI, 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; 17:295-305. doi: 10.1097/MCO.0000000000000077

Rodrigues-Krause J, Krause M, O'Hagan C, De Vito G, Boreham C, Murphy C, Newsholme P and Colleran G (2012) Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? *Cell Stress Chaperones* 17:293-302. doi: 10.1007/s12192-011-0319-x

Sobrino A, Oviedo PJ, Novella S, Laguna-Fernandez A, Bueno C, Garcia-Perez MA, Tarin JJ, Cano A, Hermenegildo C. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor. *J. Mol. Endocrinol* 2010; 44: 237-246.

Stice JP, Chen L, Kim S-C, Jung JS, Tran AL, Liu TT, Knowlton AA. 17 β -Estradiol, Aging, Inflammation, and the Stress Response in the Female Heart. *Endocrinology* 2011; 152(4): 1589–1598.

Tolson JK, Roberts SM. Manipulating heat shock protein expression in laboratory animals. *Methods*. 2005 Feb;35(2):149-57. Epub 2004 Dec 19.

Wassmann S, Bäumer AT, Strehlow K, van Eickels M, Grohé C, Ahlbory K, Rösen R., Böhm M, Nickenig G (2001) Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 103:435-441.

Wick G, Jakic B, Buszko M, Wick MC and Grundtman C. The role of heat shock proteins in atherosclerosis *Nat. Rev. Cardiol.* 2014; 11: 516–529 doi:10.1038/nrcardio.2014.91;

Zou W (2011) Ovariectomy (oophorectomy) *Protoc Exch.* doi:10.1038/protex.2011.242.

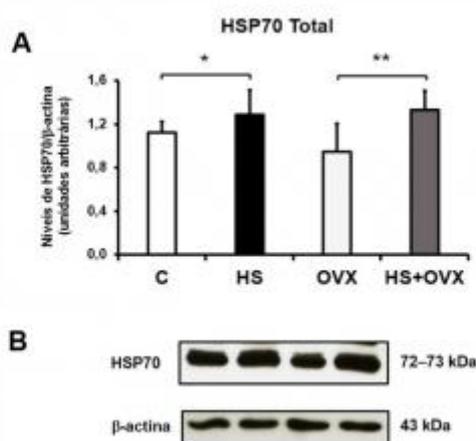


Figura 1. Expressão de iHSP70, por Western Blot, no arco aórtico. Valor de significância para (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls, $p = 0,0324$. Valores de iHSP70 foram normalizados pelo conteúdo celular de beta-Actina.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa