

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

PERFIL HEMATOLÓGICO E GLICÊMICO EM RATAS OVARIETOMIZADAS E SUBMETIDAS À TERAPIA DE CHOQUE TÉRMICO¹

Jaíne Borges Dos Santos², Yana Picinin Sandri Lissarassa³, Analú Bender Dos Santos⁴, Carolain Felipin Vincensi⁵, Thiago Gomes Heck⁶, Mirna Stela Ludwig⁷.

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

² Acadêmica do curso de Enfermagem - UNIJUI, Bolsista PIBIC/CNPq, 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 Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Mestranda Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS) UNIJUI/UNICRUZ

⁵ 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

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

A menopausa é um evento do climatério caracterizado pela amenorreia, causada pela falta de E2, gerada pela falência ovariana ou pela retirada dos ovários (ovariectomia). O E2 desempenha papel fundamental na função reprodutiva e participa da regulação de outros processos como o metabolismo de lipídios e glicose, agindo nos tecidos adiposo, muscular, nervoso e cardíaco (MONTEIRO; TEIXEIRA; CALHAU, 2014). Sua falta, portanto, pode acarretar alterações metabólicas, que são determinantes para o estabelecimento de um estado pró-inflamatório crônico. É observado aumento dos níveis de marcadores pró-inflamatórios, tais como a interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-945; (TNF-945;), indicando uma forte ligação entre os baixos níveis de E2 e a inflamação (CENCI et al., 2000).

O sistema imune também pode ser comprometido após a menopausa devido à diminuição da concentração de estrogênio, em razão do declínio da quantidade de linfócitos T e B, com consequências sobre o desenvolvimento de doenças infecciosas, neoplasias e inflamações crônicas (FARIA et al., 2013).

A investigação acerca de mecanismos endógenos envolvidos nas disfunções pós-menopáusicas, bem como mecanismos de citoproteção capazes de prevenir danos e reduzir o risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias, é importante na perspectiva de minimizar agravos decorrentes da baixa concentração de E2. Entre os mecanismos de citoproteção, destacamos a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), a qual apresenta ação anti-inflamatória. Na falta de E2, a produção desta proteína também pode ser negativamente influenciada (HAMILTON et al. 2004).

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

Entre os fatores indutores da expressão de HSP70 podemos citar o estresse térmico (ANSCKAR E SISTONEN, 2011). Para tanto, no presente trabalho foi investigado o efeito da ovariectomia sobre o perfil glicêmico e hematológico e o respectivo efeito da terapia de choque térmico sobre os referidos parâmetros.

METODOLOGIA

Foram utilizados 32 ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*) virgens, adultas com 20 semanas de idade, provenientes do biotério da UNIJUÍ. Os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro 12h/12h, temperatura ambiente de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar a 60%, alimentados ad libitum, com ração padrão (NUVILAB), contendo aproximadamente 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos e com livre acesso a água. Projeto aprovado pelo Comitê de Ética da UNIJUÍ, Parecer N° 003-15.

Grupos experimentais: Os animais foram alocados nos seguintes grupos de acordo com o tratamento: Controle (C): animais submetidos à falsa cirurgia e mantidos em normotermia; Terapia de choque térmico (TCT): animais submetidos à terapia de choque térmico e falsa cirurgia; 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 de choque térmico.

Ovariectomia: Remoção cirúrgica bilateral dos ovários. Os animais foram anestesiados, 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.

Terapia de choque térmico: Os animais dos grupos experimentais TCT e OVX+TCT foram submetidos à terapia de choque térmico em sessões semanais (1x/semana), por um período de 12 semanas. Em cada sessão, os animais foram anestesiados com xilazina 10 mg.kg⁻¹ (0,05 mL de xilazina 2% para 100 g de rato) e cetamina 90 mg.kg⁻¹ i.p. (0,09 mL de cetamina 10% para 100 g de rato) para supressão do controle da temperatura e indução da hipertermia. Foram colocados em um recipiente (banho) com água a 42 °C, tendo a temperatura monitorada com termômetro retal. Tão logo apresentaram temperatura corporal de 41 °C, os animais foram mantidos no banho durante quinze minutos (CHUNG et al., 2008). Os animais dos grupos não submetidos ao choque térmico (grupos C e OVX) também foram anestesiados, porém mantidos em banho com água de 37 °C e temperatura corporal entre 36,5-37,5 °C, monitorada com termômetro retal.

Teste de Tolerância a Glicose: Os testes de tolerância à glicose (GTT) foram realizados em todos os grupos experimentais em diferentes momentos de tratamento, ou seja, no tempo zero (antes da cirurgia), na 4^a, 8^a e 12^a semana de terapia de choque térmico. Os testes foram realizados 48h após a sessão de choque térmico da semana e com os animais em jejum de 12 horas. Para a realização do teste de tolerância à glicose, foi preparada uma solução de glicose 80% (m/v), administrada na concentração 1g/kg, por via intraperitoneal (IPGTT). Para a obtenção da curva glicêmica, o valor da glicemia em jejum foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos (tempo zero) e nos tempos de 30 e 120 minutos após a injeção de glicose. As medidas da glicemia foram realizadas com sangue total em punção na parte distal da cauda dos animais, usando aparelho de leitura glicêmica capilar, glicosímetro, OptiumXceed da Abbott.

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

Coleta das amostras: Para coleta do sangue os animais foram mortos por decapitação, e o sangue troncular foi coletado em tubo com anticoagulante (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos (5 μ L de EDTA/500 μ L de sangue total).

Hemograma: Para a determinação automatizada foi utilizado o analisador hematológico Micros 60 (Horiba), seguindo as recomendações do fabricante. Através desse equipamento foi possível obter os seguintes parâmetros: contagem total de hemácias, hematócrito, hemoglobina, índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), amplitude de distribuição dos eritrócitos - RDW; contagem total de leucócitos (WBC), contagem relativa e absoluta de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) além da contagem de plaquetas (Horiba).

Análise estatística: Os dados foram apresentados em média \pm DP, sendo analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste post-hoc de Tukey, com um nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que não houve diferença no perfil glicêmico (figura 1 A e B) antes e após a ovariectomia. Constatou-se que todos os animais, independente da intervenção aplicada, apresentaram padrões de normoglicemia. A ovariectomia não alterou a resposta glicêmica a sobrecarga de glicose (figura 1 C e D) durante o teste de tolerância a glicose, logo o tratamento com o choque térmico não desempenhou seu papel em melhorar a glicemia.

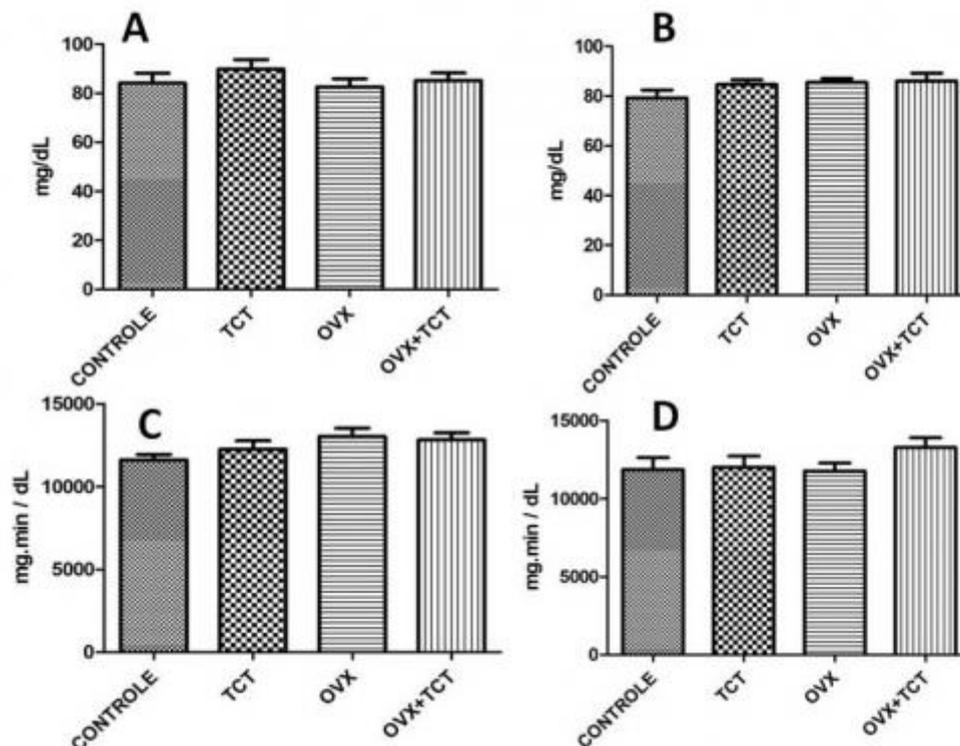


Figura 1. Avaliação da glicemia de jejum e tolerância a glicose, por meio da área sob a curva (ASC) durante as 12 semanas de terapia de choque térmico em ratos Wistar fêmeas ovariectomizadas. (A) glicemia antes da cirurgia (T=0),

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

P=0,4958. (B) glicemia após a 12ª semana de tratamento (T=12), P=0,2421. (C) ASC antes da cirurgia (T=0), P=0,1879. (D) ASC após a 12ª semana de tratamento (T=12), P=0,8057. Análise estatística realizada por ANOVA de uma via, seguido de teste post-hoc de Tukey, considerando significância valor do $P < 0,05$.

Em relação ao perfil hematológico, foram analisados diversos parâmetros relacionados ao eritrograma, como a concentração de hemácias, hematócrito, concentração de hemoglobina e índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) (tabela 1). Não foram observadas alterações nestes parâmetros, em nenhum dos grupos experimentais.

Outros parâmetros hematológicos analisados se referem ao leucograma e a contagem de plaquetas. Neste último item, não foi observada diferença entre os grupos experimentais. Com relação a contagem total de leucócitos (WBC) e seus subtipos, como linfócitos, segmentados, bastonetes, eosinófilos, monócitos, os resultados apontam alterações. O grupo de animais ovariectomizados e submetidos à terapia de choque térmico (OVX + TCT) apresentaram maior concentração de leucócitos circulantes, quando comparado ao grupo controle (tabela 1). Em relação aos subtipos, observa-se também que a concentração de linfócitos é elevada no grupo OVX + TCT, quando comparado ao grupo C e também em relação ao grupo TCT (tabela 1).



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

Tabela 1: Parâmetros Hematológicos dos grupos (C) Controle, (TCT) Terapia de choque térmico, (OVX) ovariectomia, (OVX+TCT) ovariectomia + terapia de choque térmico.

Variável	Grupos				ANOVA (valor de P)
	C	TCT	OVX	OVX+TCT	
WBC ($10^3/mm^3$)	4,40±0,90	4,65±0,93	4,55±0,22	5,63±0,42*	0,0246
Bastão (unidade)	47±9	54±16	48±6	56±4	0,1078
Neutrófilo (unidade)	412±64	398±57	413±164	427±148	0,9824
Eosinófilo (unidade)	19±25	9±19	0,00	7±20	0,2399
Monócitos (unidade)	216±27	242±97	197±39	219±33	0,5038
Linfócitos (unidade)	3646±731	3724±578	4050±435	4898±529**	0,0021
Bastão (%)	1,14±0,37	1,33±0,5	1±0	1±0	0,1228
Neutrófilo (%)	11,3±4,00	13,3±6,10	10,2±3,80	8,2±3,71	0,1787
Eosinófilo (%)	0,42±0,53	0,22±0,44	0±0	0,14±0,37	0,1915
Monócito (%)	4,42±0,78	4,55±0,88	4,22±0,66	3,71±0,75	0,1900
Linfócito (%)	83,0±3,7	80,6±6,8	85,2±3,7	87,0±4,6	0,0944
RBC ($10^6/mm^3$)	6,78±0,59	6,62±1,33	7,14±1,07	6,63±0,88	0,6957
HGB (g/dL)	14,4±1,04	13,8±0,37	14,6±1,14	13,9±1,08	0,3516
HCT (%)	37,5±2,99	35,6±6,37	38,8±4,15	36,7±3,09	0,5208
PLT ($10^3/mm^3$)	664±81	621±111	660±58	638±99	0,7472
MCV (fm^3)	55,3±1,70	54,1±2,20	54,7±3,45	55,4±3,45	0,7335
MCH (pg)	21,3±0,91	21,1±1,62	20,7±1,55	21,1±1,31	0,8166
MCHC (g/dL)	38,8±0,79	38,3±1,22	37,8±1,40	38,1±0,74	0,4335
RDW (%)	13,84±0,87	13,6±0,83	13,7±0,80	13,9±0,50	0,1787

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

Grupos experimentais: controle (C), terapia de choque térmico (TCT), ovariectomia (OVX), ovariectomia + terapia de choque térmico (OVX+TCT). Leucócito (WBC); Eritrócitos (RBC); Hemoglobina (HBG); Hematócrito (HCT); Volume corpuscular médio (MVC); Hemoglobina corpuscular média (MCH); Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC); Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW). ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. Resultados descritos em média \pm dp. N= 7-9. WBC * P<0,05 vs C; Linfócitos ** P<0,05 vs C e TCT.

A redução de estrogênio após a ovariectomia pode estar associada ao aumento de marcadores inflamatórios. Não observamos alterações no leucograma dos animais ovariectomizados (OVX). Porém, a resposta dos animais ovariectomizados e submetidos à terapia de choque térmico (OVX + TCT) pode sinalizar uma possível ativação imunológica neste grupo. Outros estudos mostram que a hipertermia, em tratamento repetitivo (terapia), causa aumento da concentração de leucócitos, especialmente do tipo linfócitos (TOMIYAMA et al., 2015).

A terapia térmica por calor induz a expressão de HSP70, cujo efeito intracelular é anti-inflamatório. Contudo, esta proteína é também liberada para o plasma, onde exerce ação estimuladora sobre o sistema imunológico (KRAUSE et al., 2015), o que poderia explicar o efeito da terapia térmica sobre o aumento da concentração de linfócitos, observada no grupo de animais ovariectomizados e submetidos a terapia de choque térmico.

CONCLUSÃO

A ovariectomia não causou alteração na glicemia de jejum, na resposta glicêmica à sobrecarga de glicose e nos parâmetros hematológicos relativos ao eritrograma. Entretanto, animais ovariectomizados e submetidos à terapia térmica apresentam linfocitose, sinalizando ativação do sistema imunológico.

PALAVRAS-CHAVE: Menopausa; ovariectomia; leucócitos; linfócitos; terapia térmica; glicemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSCKAR, J E SISTONEN,L. Regulation of HSF1 Function in the Heat Stress Response: Implications in Aging and Disease. *Annual Review of Biochemistry*,v.80, p. 1089-1115, 2011.
- CENCI, S. et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *Journal of Clinical Investigation*, v. 106, n. 10, p. 1229–1237, 2000.
- CHUNG, J. et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 5, p. 1739–44, 2008.
- KRAUSE, M. et al. The Chaperone Balance Hypothesis: The Importance of the Extracellular to Intracellular HSP70 Ratio to Inflammation-Driven Type 2 Diabetes , the Effect of Exercise , and the Implications for Clinical Management. v. 2015, 2015.
- MONTEIRO, R.; TEIXEIRA, D.; CALHAU, C. Estrogen signaling in metabolic inflammation. *Mediators of inflammation*, v. 2014, p. 615917, jan. 2014.
- TOMIYAMA, C. et al. The effect of repetitive mild hyperthermia on body temperature, the autonomic nervous system, and innate and adaptive immunity. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*, v. 36, n. 2, p. 135-42, 2015.