

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**EFEITO AGUDO DO CHOQUE TÉRMICO ASSOCIADO AO EXERCÍCIO,
SOBRE OS TECIDOS ADIPOSE BRANCO EPIDIDIMAL E HEPÁTICO EM
RATOS WISTAR OBESOS¹**

**ACUTE EFFECT OF HEAT SHOCK ASSOCIATED TO THE EXERCISE ON
THE WHITE EPIDIDIMAL TISSUE AND HEPATIC IN WISTAR OBESOS
RATS**

**Jaíne Borges Dos Santos², Analú Bender Dos Santos³, Lucas Machado
Sulzbacher⁴, Lilian Côrrea Costa Beber⁵, Thiago Gomes Heck⁶, Mirna Stela
Ludwig⁷**

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

² Acadêmica de Enfermagem da UNIJUI. Bolsista PIBIC-CNPq. Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF.

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS)UNIJUI/UNICRUZ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF.

⁴ Acadêmico de Enfermagem da UNIJUI. Bolsista PROBIC-FAPERGS. Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF.

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

⁶ Docente do 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). Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF.

⁷ Docente do 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). Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF.

INTRODUÇÃO: O excesso de peso e a obesidade representam uma ameaça crescente para a saúde da população em um número cada vez maior de países. A prevalência de obesidade cresceu nas últimas décadas, configurando-se como um dos problemas prioritários de saúde pública da atualidade, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento (ALINE et al, 2015). Ela é caracterizada pelo excesso de gordura corporal, sendo desencadeada principalmente pela inatividade física (HALLAL et al., 2012) e por uma alimentação rica em gorduras.

O exercício físico é uma das medidas profiláticas e de tratamento para a obesidade, uma vez que eleva o gasto energético, reduz o Índice de Massa Corporal (IMC), a taxa de gordura, melhora a aptidão cardiorrespiratória e as variáveis hemodinâmicas (VASCONCELOS et al, 2013). Além disso, possibilita a oxidação de ácidos graxos e possui ação anti-inflamatória, o que desencadeia maior proteção contra os danos oxidativos às moléculas proteicas e lipídicas (FIUZA-LUCES et al., 2013). Além do exercício físico, outras medidas alternativas têm sido avaliadas no tratamento da obesidade, entre elas a terapia de choque térmico. O aumento da temperatura corporal pelo choque térmico induz a expressão de HSP70, uma proteína essencial para a manutenção da

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

homeostase proteica e celular sob condições fisiológicas e de estresse (ANCKAR; SISTONEN, 2011). Ela age como chaperona molecular, transportando proteínas intracelulares em células sob estresse e auxiliando no dobramento e estabilização da estrutura quaternária de proteínas danificadas, tendo uma função citoprotetora (JAATTELA, 1999).

Os benefícios produzidos pelo exercício e pelo choque térmico apresentam em comum o aumento da expressão celular da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), que desempenha função intracelular anti-inflamatória (KRAUSE et al., 2015). Em função disso, desenvolvemos o presente trabalho com o objetivo de avaliar o efeito agudo do choque térmico, associado ao exercício físico, sobre a expressão celular de HSP70 nos tecidos adiposo branco epididimal e hepático em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica.

METODOLOGIA: Foi realizado estudo experimental, in vivo e prospectivo. **Animais:** 50 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) virgens, adultos com 12 semanas de idade, provenientes do biotério da UNIJUI. 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 comercial padrão para ratos de laboratório, NUVILAB, ou ração hiperlipídica produzida no Laboratório de Ensaios Biológicos da UNIJUI, com livre acesso a água. **Detalhamento do experimento:** Foi realizado após a 12ª semana um período de adaptação à esteira por cinco dias consecutivos, após o qual estes animais foram divididos em oito grupos experimentais com $n = 5-8$: **a) Animais que receberam ração padrão:** M - Controle (sedentário); M+E - Exercício; M+HS - Choque Térmico (sedentário); M+E+HS - Exercício + Choque Térmico. **b) Animais que receberam ração hiperlipídica:** O - Obeso (sedentário); O+E - Obeso + Exercício; O+HS - Obeso + Choque Térmico (sedentário); O+E+HS - Obeso + Exercício + Choque Térmico.

Após a semana de adaptação à esteira, com dois dias sem nenhuma manipulação os animais dos grupos M+E, M+E+HS, O+E e O+E+HS realizaram uma sessão de exercício à 8 metros/minuto, intensidade leve, enquanto os grupos M, M+HS, O e O+HS permaneceram sedentários. Após 36h da sessão de exercício, os grupos HS, M+E+HS, O+HS e O+E+HS passaram por uma sessão de choque térmico, enquanto os grupos M, M+E, O, e O+E permaneceram normotérmicos. Após 12 horas da sessão de choque térmico o material biológico foi coletado para posterior análise biomolecular.

Adaptação: Após 12 semanas de consumo de ração hiperlipídica e antecedendo a sessão de exercício ou o protocolo de treinamento, todos os animais passaram por um período de adaptação à esteira rolante durante 5 dias consecutivos, aumentando progressivamente e diariamente o tempo 5-10min, e a velocidade da esteira de 2 a 4 m/min. **Exercício aeróbio:** Foi realizada uma única sessão de exercício aeróbio leve, $\sim 30\%$ do VO_2max , na velocidade de 8 m/minuto com a duração de 20 minutos em esteira rolante sem inclinação. A esteira possui 8 raia individuais. **Choque térmico:** Ocorreu uma vez após 36h da sessão de exercício. Para tanto 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 hipotalâmica. Estes animais foram colocados em um recipiente (banho) com água a 42°C , com a maior parte do corpo submerso (exceto cabeça e membros anteriores). A

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

temperatura dos animais foi monitorada com termômetro retal durante todo o período em que eles estiveram no banho. Tão logo apresentaram temperatura central de 41 °C permaneceram no banho, com monitoramento contínuo da temperatura central (41-41,5 °C) e do banho (41-42°C), durante 15 minutos (BATHAIE et al., 2010; CHUNG et al., 2008). Os animais dos grupos não submetidos ao choque térmico (grupos M, M+E, O e O+E) também foram anestesiados, porém mantidos com temperatura central entre 36,5-37,5 °C, monitorada com termômetro retal, em um recipiente com água (banho). Após o período de banho, os animais permaneceram no laboratório, mantidos na temperatura ambiente de 22-24 °C, até recuperação da anestesia e, em seguida, foram hidratados com solução fisiológica (~3 mL/animal).

Ração padrão: Os grupos controles receberam ração padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1), comercialmente obtida a partir de Nuvital Nutrientes S.A. (total de energia metabolizável: 16,6 MJ / kg, sendo 11,4% gorduras, 62,8% carboidratos e 25,8% proteínas). Ração hiperlipídica: Os grupos obesos receberam ração hiperlipídica a base de banha (energia metabolizável total: 22,8 MJ / kg, sendo 58,3 % de gorduras, 24,5% e 17,2% de proteínas). Todos os ingredientes da ração hiperlipídica (exceto carboidrato e banha de porco) foram ajustados para estarem presentes na mesma proporção que no grupo controle (BOCK et al., 2015).

Expressão de HSP70: As amostras foram homogeneizadas em tampão SDS 0,1% para mensurar expressão de HSP70, por Western Blot (LAEMMLI, 1970). As imagens referentes à expressão de HSP70 e actina foram quantificadas com o uso do programa ImageJ. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de HSP70/ β -actina. Dosagem de proteínas: A concentração de proteínas foi determinada pelo método espectrofotométrico de Bradford (1976), a 595nm. Os resultados foram expressos em mg de proteínas por ml de amostra. O projeto de pesquisa encontra-se **APROVADO** junto à Comissão de Ética para Uso de Animais - CEUA, da UNIJUI, conforme PARECER CONSUBSTANCIADO N°. 001/2015.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Observamos no nosso estudo que somente o exercício causou elevação na concentração de HSP70 no tecido adiposo branco epididimal de animais obesos (O+E), quando comparados às demais intervenções. A maior concentração de HSP70 intracelular indica uma resposta citoprotetora mais intensa, como estratégia de defesa contra danos teciduais, aos quais animais obesos que realizaram somente o exercício estiveram mais propensos. A exposição à combinação de dois desafios sucessivos, exercício e choque térmico, (O+E+HS), não foi capaz de potencializar o efeito observado na condição de exercício. Tal achado demonstra que a obesidade afeta a capacidade de resposta ao estresse em um período de tempo de até 48 horas (tempo desde a intervenção até a coleta dos tecidos). Sugere também que em animais obesos os tratamentos podem tornar-se antagonistas se realizados combinados em um intervalo de tempo reduzido (36 horas), podendo anular os benefícios do exercício sobre o aumento da expressão de HSP70 no tecido adiposo.

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

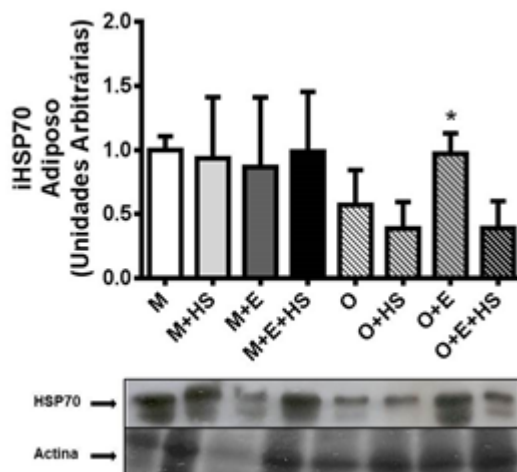
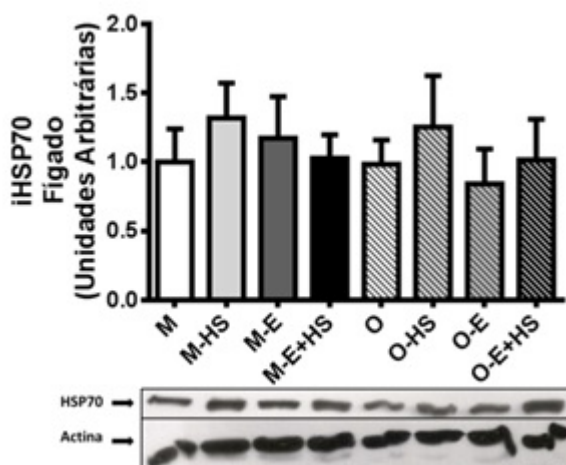


Figura 1. Concentração de iHSP70 no tecido adiposo epididimal. Os valores estão expressos como média \pm DP. Análise estatística por ANOVA de uma via seguida do pós teste de *Tukey*. * $P < 0,05$ vs O+HS, O+E+HS. N=4-6 por grupo.

Quando analisada a concentração de HSP70 hepática (fig. 2), não se constata alteração nos animais obesos e nos magros, em qualquer condição experimental. Um estudo com delineamento similar mostrou que a expressão máxima dessa proteína em tecido hepático ocorre entre 12 e 48 horas após a sessão (OKA et al., 2013). Contudo, apesar de, em nosso estudo, os tecidos terem sido coletados 12 horas após a sessão de choque térmico, não foi detectada alteração nesse parâmetro no tecido hepático de animais obesos. Em outro estudo, no qual também foram utilizados ratos Wistar como modelo experimental, foi observado que a obesidade deprime a via inflamatória de HSP70 no fígado, diminuindo a concentração dessa proteína. Isso sugere que a obesidade possa ter influência direta na não detecção de alteração na concentração dessa proteína no tecido hepático (CANGERI; NASO, 2013).



Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Figura 2. Concentração de iHSP70 hepática. Os dados estão expressos como média \pm DP. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida do pós teste de *Tukey*. $P=0,1115$. $N=4-6$ por grupo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: O choque térmico, isoladamente ou associado ao exercício físico, não foi capaz de produzir elevação na concentração de HSP70 nos tecidos adiposo branco epididimal e hepático, em ratos Wistar obesos, sugerindo que a combinação das intervenções, aplicadas em um curto intervalo de tempo, possa causar prejuízo à resposta citoprotetora ao estresse.

Palavras-chave: Proteínas de choque térmico; Obesidade; Exercício físico.

Keywords: *Heat shock proteins; Obesity; Physical exercise.*

REFERÊNCIAS

ALINE, R.; FERREIRA, B.; AQUINO, H. D. Obesidade em mulheres brasileiras : associação com paridade e nível socioeconômico. v. 37, n. 11, p. 337-342, 2015.

ANCKAR, J.; SISTONEN, L. Regulation of HSF1 Function in the Heat Stress Response : Implications in Aging and Disease. 2011.

BATHAIE, S.Z.; JAFARNEJAD, A.; HOSSEINKHANI, S.; NAKHJAVANI, M. The effect of hottub 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

BOCK DG, Caseys C, Cousens RD, Hahn MA, Heredia SM, Hubner S, et al. What we still don't know about invasion genetics. Mol. Ecol. 2015;24:2277-2297.

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.

CANGERI, F.; NASO, D. Diabetes e obesidade ativam vias pró-inflamatórias associadas com a progressão da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica : Estudo translacional Diabetes e obesidade ativam vias pró-inflamatórias associadas com a progressão da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica : Estudo translacional. 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.

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

FIUZA-LUCES, C. et al. Exercise is the Real Polypill. p. 330-358, 2013.

LAEMMLI, U. K., Molbert, E., Showe, M., and Kellenberger, E., *J. Mol. Biol.*, 49, 99 (1970)

HALLAL, P. C. et al. Physical Activity 1 Global physical activity levels : surveillance progress , pitfalls . *The Lancet*, v. 380, n. 9838, p. 247-257, 2012.

JAATTELA, M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. v. 27, n. 19, p. 261-271, 1999.

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.

OKA, K. et al. Molecular and Cellular Endocrinology Molecular cloning and characterization of the corticoid receptors from the American alligator. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 365, n. 2, p. 153-161, 2013.

VASCONCELLOS, F. V. A. et al. Exercício físico e síndrome metabólica. *Revista HUPE*, v. 12, n. 4, p. 78-88, 2013.