

**UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL**  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Área: Fisiologia

Tratamento crônico com choque térmico reduz o acúmulo de lípidos e marcadores inflamatórios em aorta de camundongos ateroscleróticos, aumentando o fluxo sanguíneo e a sobrevida dos animais

Maciel Alencar Bruxel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia) como requisito parcial para obtenção do grau de MESTRE

Orientador:  
Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.

Porto Alegre  
2014

Maciel Alencar Bruxel

Tratamento crônico com choque térmico reduz o acúmulo de lípidos e marcadores inflamatórios em aorta de camundongos ateroscleróticos, aumentando o fluxo sanguíneo e a sobrevida dos animais.

Comissão Julgadora da Dissertação  
para obtenção do grau de Mestre

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Poli Mara Spritzer  
Relatora/Presidente

Prof<sup>a</sup>. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira  
1º. Examinador

Prof. Dr<sup>a</sup>. Roselis Silveira Martins da Silva  
2º. Examinador

Porto Alegre, 1º de Setembro de 2014.

## DEDICATÓRIA

Dedico esta obra a minha família\*  
e aos meus professores, que me deram  
excelentes exemplos ao longo de toda a  
minha vida.

\* em especial:

*Cenira Celíra de Lima Cerveira*  
*Pedro Eloi Cerveira (in memoriam)*  
*Adolfina Rost Bruxel (in memoriam)*

## AGRADECIMENTOS

Era junho, estava frio e chovia. Não que eu realmente lembre, apenas é como eu imagino que fosse!; Todos a minha volta admirando tamanha ~~para não dizer gorda~~ criança e ‘branquela’. E nossos olhos se encontraram e mutuamente decidimos nos amar para sempre, e constituímos uma FAMÍLIA...

*Joini Adir Bruxel*  
*Carmem Cenilda Cerveira Bruxel*  
*Amábili Francieli Bruxel*  
*Taylãn Cassiano Bruxel*

E o tempo passou... me levou e trouxe outras mais! Como o perfume das mãos daquele que oferece flores, em mim permaneceu o melhor que pude ver em cada AMIGO que encontrei. Afinal, hoje sou o mesmo que era há cinco anos, exceto por duas razões:  
i- pelos livros que li; ii- pelas pessoas que conheci...

*Aquiles Gilberto dos Santos da Cruz*  
*Mirna Stela Ludwig*  
*Remi Dama*  
*Volnei de Almeida Teixeira*  
*Thiago Heck*  
*Pauline Brendler Goettens Fiorim*  
*Bethânia Salamoni*  
*Fernanda Giesel Baldissera*  
*Maicon Machado Sulzbacher*

Novos desafios vieram e após dia a dia tentando... aprendi. Não se constrói sozinho, nem tão pouco se cresce. Nos organizamos, nos completamos e nos fortalecemos!  
Trabalhamos em equipe, e chamei-os de COLEGAS...

*Patrícia Martins Bock*  
*Cinthia Schöler*  
*Ângela Maria Vicente Tavares*  
*Luiz Zavarize*  
*Victor Borges*  
*Rossana Rosa Porto*  
*Maria Inês Lavina Rodrigues*  
*Bolivar Bertoldo Bandeira*  
*Helena Schroeder*  
*Maurício Krause*  
*Maycon de Cesare*  
*Antonio Azambuja Miragem*  
*Maria Rita (Dona Ritinha)*  
*Jeferson Ferraz Goularte*  
*Ana Lúcia Hoefel*

*Larissa Paixão Lucas de Oliveira*  
*Amanda de Avila Bicca Martins*  
*Samir Khal de Souza*  
*Denise Dos Santos Lacerda*  
*Elaine Sarapio*  
*Grace Violeta Espinoza Pardo*  
*Luciana Abreu da Rosa*  
*Deborah Teixeira*  
*Felipe Coutinho Kullmann Duarte*  
*Juliana Oliveira Rangel*  
*Bettega Costa Lopes*  
*Fernanda Carvalho Cavalari*

Encontrei muitas pessoas... Estabeleci muitos laços... Pensei ter encontrado apenas um  
ORIENTADOR, mas estava enganado! Ele foi um pai, um amigo, um colega...  
Ofereceu-me mais que uma oportunidade!; Um lar...

*Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.*  
*Mirian Sant'Helena*  
*Guilherme Sant'Helena*  
*Laura Bittencourt*  
*Lucca Bittencourt*

Resumir em uma palavra o que/como foi ter cruzado vossos caminhos:  
uma HONRA!

BRUXEL, M. A. **Tratamento crônico com choque térmico reduz o acúmulo de lipídeos e marcadores inflamatórios em aorta de camundongos ateroscleróticos, aumentando o fluxo sanguíneo e a sobrevivência dos animais.** Dissertação de Mestrado, 2014, [Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

## RESUMO

A aterosclerose é uma doença cardiovascular (DCV) que afeta 4 em cada 1.000 pessoas, e é caracterizada por lesões arteriais inflamatórias que evoluem com o desenvolvimento da doença. Está envolvida neste processo uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias cuja expressão é mediada pela ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), responsável por desencadear processos de proliferação celular e migração de células musculares lisas nas regiões de lesões arteriais, contribuindo para o agravamento da doença. Estudos de nosso laboratório mostraram que prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs), que são anti-inflamatórias, revertem as lesões ateromatosas em modelos animais, num processo que depende da indução de proteínas de choque térmico - HSP (do inglês *Heat Shock Protein*) por estas CP-PGs. HSPs impedem a desnaturação de proteínas intracelulares e “desligam” o fator nuclear NF-κB, que é um dos principais envolvidos na doença inflamatória vascular da aterosclerose. Por isso, decidimos investigar o efeito direto da expressão de HSPs via choque térmico, no processo inflamatório da aterosclerose, pelo método de “*hot tub*” realizado semanalmente em camundongos machos nocaute para o receptor de LDL (KO-LDLr), em dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica. Para avaliar estes efeitos os animais foram semanalmente (num período de oito semanas) submetidos a um banho térmico elevando a temperatura corporal para 41,5°C por 15 min. Os resultados demonstraram que, na aorta torácica, o choque térmico aumentou a expressão da HSP70 em cerca de 50% o que foi acompanhado de aumento de 100% na expressão do fator de choque térmico – HSF e dramática queda na ativação do fator NF-κB (75%). Em paralelo, o choque térmico reduziu em mais de 50% a deposição de lipídeos na parede da aorta e na gordura epididimal e a lipoperoxidação em cerca de 40%. As análises com ultrassonografia Doppler demonstraram que o choque térmico melhorou o fluxo sanguíneo, reduziu a espessura da parede aórtica e melhorou a performance cardíaca. O tratamento também melhorou o status glicêmico (redução de glicemia de jejum e aumento de sensibilidade à insulina) além de reduzir significativamente os valores de colesterol total e LDL, aumentando a proporção de HDL. Os mecanismos envolvidos nestes efeitos benéficos do tratamento com choque térmico encontram-se em estudo em nosso laboratório.

**Palavras Chave:** Aterosclerose. Inflamação. HSP. NF-κB. Fluxo Sanguíneo.

BRUXEL, M. A. **Chronic treatment with heat shock reduces the accumulation of lipids and inflammatory markers in the aorta of atherosclerotic mice, increasing blood flow and survival of animals.** Dissertação de Mestrado, 2014. [Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

## ABSTRACT

Atherosclerosis is a cardiovascular disease (CVD) that affects four in every 1,000 people, and is characterized by inflammatory arterial lesions which evolve with the development of the disease. It is involved in this process a high production of proinflammatory cytokines whose expression is mediated by the activation of nuclear transcription factor kappa B (NF- $\kappa$ B), responsible for triggering the processes of cell proliferation and migration of smooth muscle cells into the arterial lesions, thus contributing to the worsening of the disease. Studies of our laboratory have shown that cyclopentenone prostaglandins (CP-PGs), which are anti-inflammatory, revert atherosclerotic lesions in animal models in a process that depends on the induction of heat shock proteins - HSPs by these CP-PGs. HSPs prevent denaturation of intracellular proteins and "turn off" nuclear factor NF- $\kappa$ B, which is a major player involved in the inflammatory vascular disease that accompanies atherosclerosis. Therefore, we decided to investigate the effect of the direct expression of HSPs via heat shock, on the inflammatory process of atherosclerosis, by the "hot tub" method performed weekly in male mice knockout for the LDL receptor (LDLr-KO) under a high fat and hypercholesterolemic diet. To assess these effects, the animals were weekly subjected to a thermal bath (for a period of eight weeks) by raising the body temperature to 41.5 ° C for 15 min. The results demonstrated that in the thoracic aorta, the heat shock increased HSP70 expression approximately 50%, which was accompanied by an increase of 100% in the expression of heat shock factor - HSF and a dramatic decrease in the activation of nuclear factor NF- $\kappa$ B (75%). In parallel, heat shock decreased by more than 50% lipid deposition in the aortic wall and in the epididymal fat, and lipid peroxidation by about 40%. Ultrasound with Doppler analysis showed that heat shock improved blood flow, reduced thickness of the aortic wall and improved cardiac performance. The treatment also improved the glycemic status (reduction of fasting blood glucose and increased insulin sensitivity) and significantly lower levels of total and LDL cholesterol and by increasing the rates of HDL. The mechanisms involved in these beneficial effects of treatment with heat shock are under investigation in our laboratory.

**Keywords:** Atherosclerosis. Inflammation. HSP. NF- $\kappa$ B. Blood Flow.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <b>Esquema estrutural de uma lipoproteína plasmática</b> .....	8
Figura 2. <b>Metabolismo normal das lipoproteínas</b> .....	11
Figura 3. <b>Estágios do desenvolvimento das lesões ateroscleróticas</b> .....	16
Figura 4. <b>Via clássica de ativação do NF-<math>\kappa</math>B</b> .....	21
Figura 5. <b>Imunodeteção de LDLr</b> .....	28
Figura 6. <b>Representação esquemática das formas geométricas formadas pela curva</b> .....	31
Figura 7. <b>Efeito do tratamento de “choque térmico” no ganho de massa corporal</b> .....	44
Figura 8. <b>Comparação do ganho de massa corporal nos grupos experimentais por semana de tratamento</b> .....	45
Figura 9. <b>Índice de Lee</b> .....	46
Figura 10. <b>Consumo calórico diário</b> .....	47
Figura 11. <b>Análise de sobrevivência, hipótese probabilística de Kaplan-Meier</b> .....	48
Figura 12. <b>Aparência epidérmica macroscópica como reflexo do tratamento de choque térmico</b> .....	49
Figura 13. <b>Testes de tolerância à glicose e análise da área sob a curva</b> .....	51
Figura 14. <b>Testes de tolerância à insulina e análise da área incremental sob a curva</b> .....	51
Figura 15. <b>Congestão pulmonar, avaliação de hipertrofia do pulmão</b> .....	54
Figura 16. <b>Congestão hepática, avaliação de hipertrofia do fígado</b> .....	54
Figura 17. <b>Alterações hepáticas do tratamento de choque térmico</b> .....	55
Figura 18. <b>Hipertrofia miocárdica ventricular</b> .....	55
Figura 19. <b>Taxa de deposição de gordura epididimal</b> .....	56

Figura 20. <b>Taxa de lipoperoxidação</b> .....	58
Figura 21. <b>Efeito do “choque térmico” na deposição lipídica da aorta, aspecto macroscópico</b> .....	59
Figura 22. <b>Fotomicrografias da aorta, efeito do “choque térmico” na formação do ateroma</b> .....	61
Figura 23. <b>Imunodeteção de VCAM-1</b> .....	62
Figura 24. <b>Imunodeteção de SIRTUINA-1</b> .....	63
Figura 25. <b>Imunodeteção de HSF-1</b> .....	64
Figura 26. <b>Imunodeteção de HSP70</b> .....	65
Figura 27. <b>Imunodeteção de HSP72</b> .....	66
Figura 28. <b>Imunodeteção de HSP27</b> .....	67
Figura 29. <b>Concentração plasmática de HSP72</b> .....	68
Figura 30. <b>Ativação Nuclear de NF-κB</b> .....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <b>Parâmetros bioquímicos, glicose e lipídios circulantes</b> .....	53
Tabela 2. <b>Concentração dos níveis de nitratos e nitritos plasmático</b> .....	57
Tabela 3. <b>Parâmetros ecocardiográficos de Doppler pulsátil e modo-M</b> .....	72

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. <b>Desenho experimental</b> .....	29
---	----

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	2
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	5
2.1 Objetivo geral .....	5
2.2 Objetivos específicos .....	5
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	7
3.1 Doenças Cardiovasculares e Dislipidemias .....	7
3.2 Dislipidemias e a Gênese da Aterosclerose .....	10
3.3 Inflamação e Aterosclerose .....	13
3.4 Prostaglandinas, NF- $\kappa$ B e Heat Shock Proteins na Aterosclerose .....	17
<b>4 . MÉTODOS E MATERIAIS</b> .....	25
4.1 Local de Realização dos Experimentos .....	25
4.2 Resalva Ética .....	25
4.3 Estatística e Tamanho Amostral .....	26
4.4 Animais Utilizados .....	27
4.5 Modelo de Aterosclerose .....	28
4.6 Desenho Experimental .....	28
4.7 Choque Térmico .....	29
4.8 Testes de Tolerância a Glicose e Insulina .....	30
4.8.1 Teste de Tolerância IP-GTT .....	31
4.8.2 Teste de Tolerância IP-ITT .....	32
4.9 Análises Ecocardiográficas Doppler Pulsátil e Modo-M .....	32
4.10 Acompanhamento de Parâmetros Metabólicos .....	34
4.11 Morte dos Animais .....	35
4.12 Medidas Morfométricas .....	36
4.13 Dosagens Bioquímicas de Perfil Glicêmico e Lipídico .....	36
4.14 Dosagens de Nitratos e Nitritos .....	36
4.15 Lipoperoxidação TBARS .....	37
4.16 Avaliações Macro e Microscópicas da Aorta .....	37
4.17 Expressões Proteicas por Imunodeteção na Aorta .....	38
4.18 Ativação da Fração Nuclear de NF- $\kappa$ B .....	40
4.19 Determinação Plasmática de HSP72 .....	42
<b>5. RESULTADOS</b> .....	44
5.1 Monitoramento do Ganho de Massa Corporal Durante as Semanas do Tratamento de “ <i>Choque Térmico</i> ” .....	44
5.2 Ingestão Calórica de “High Fat Diet - HFD” Durante o Tratamento .....	46

5.3 Estimativa de Sobrevivência de Kaplan-Meier, Efeitos do Tratamento Crônico .....	47
5.4 Resposta a Sobrecarga Glicídica e Insulínica nos Testes de Tolerância ....	50
5.5 Aspectos Bioquímicos do Tratamento Crônico de Choque Térmico .....	52
5.6 Aspectos Morfométricos e Anatômicos de Órgãos e Tecidos Internos .....	53
5.7 Nitratos e Nitritos Como Medida Indireta de Óxido Nítrico .....	56
5.8 TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, Medida de Lipoperoxidação .....	58
5.9 Caracterizações Macroscópicas da Deposição Lipídica na Aorta .....	59
5.10 Caracterizações Microscópicas da Deposição Lipídica na Aorta, Coloração de Oil red O – Ensaio de Fluorescência .....	60
5.11 Expressões Proteicas no Tecido Aórtico, Alterações do Tratamento com Choque Térmico .....	61
5.11.1 Proteína de Adesão Celular Vascular - 1 (VCAM-1) 122kDa ...	62
5.11.2 Proteína Desacetilase NAD-dependente SIRTUNA – 1 (SIRT-1) 115 kDa .....	63
5.11.3 Proteína do Fator de Choque Térmico – 1 (HSF1) 60 kDa .....	64
5.11.4 Proteína de Choque Térmico (HSP) 70 kDa .....	65
5.11.5 Proteína de Choque Térmico (HSP) 72 kDa .....	66
5.11.6 Proteína de Choque Térmico (HSP) 27 kDa .....	67
5.12 Concentrações Plasmática de HSP70 ( <i>induzível</i> ) – HSP72 .....	68
5.13 Ativação Nuclear de NF- $\kappa$ B .....	69
5.14 Avaliações Ecocardiográficas em Doppler Pulsátil e Modo – M .....	70
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	.....	Onda A
AA	.....	Ácido Araquidônico
AG	.....	Ácido Graxo
AGLs	.....	Ácidos Graxos Livres
AGS	.....	Ácido Graxo Saturado
ANOVA	.....	Análise de Variância
IAUC	.....	Área Incremental Sob a Curva
AUC	.....	Área Sob a Curva
AVC	.....	Acidente Vascular Cerebral
CQB	.....	Certificado de Qualidade em Biossegurança
CMLV	.....	Célula Muscular Lisa Vascular
CEP	.....	Comitê de Ética em Pesquisa
CIOMS	.....	Council for International Organizations of Medical Science
COX	.....	Ciclo-oxigenase
CP-PGs	.....	Prostaglandinas Ciclopentenônicas
DAD	.....	Diâmetro Arterial Diastólico
DAS	.....	Diâmetro Arterial Sistólico
DC	.....	Débito Cardíaco
DCGSC	.....	Diretrizes Brasileiras sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular
DCV	.....	Doenças Cardiovasculares

DBCA	.....	Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos
DNA	.....	Ácido Desoxirribonucleico
DPAD	.....	Diâmetro da Parede Arterial em Diástole
DPAS	.....	Diâmetro da Parede Arterial em Sístole
E	.....	Onda E
E/A	.....	Relação onda E / onda A
EROs	.....	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	.....	Espécie Reativa de Nitrogênio
FADD	.....	Proteína Fas-associada ao Domínio de Morte Celular
FC	.....	Frequência Cardíaca
FLox	.....	Fosfolipídio Oxidado
PMSF	.....	Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
HDL	.....	Lipoproteínas de Densidade Alta
HFD	.....	High Fat Diet
HSF	.....	Fator de Choque Térmico
HSPi	.....	Proteína de Choque Térmico Induzível
HSPs	.....	Proteínas de Choque Térmico
IBGE	.....	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	.....	Índice de Distensibilidade Arterial
IDL	.....	Lipoproteína de Densidade Intermediária
IDPA	.....	Índice de Distensibilidade da Parede Arterial

IFN $\gamma$	.....	Interferon Gama
IKB	.....	Inibidor da subunidade Kappa B
IKK	.....	I $\kappa$ B Quinase
IKK $\alpha$	.....	I $\kappa$ B Quinase Alfa
IKK $\beta$	.....	I $\kappa$ B Quinase Beta
IKK $\gamma$	.....	I $\kappa$ B Quinase Gama
IL	.....	Interleucina
IL-2	.....	Interleucina - 2
IL-4	.....	Interleucina - 4
IL-8	.....	Interleucina - 8
IM	.....	Infarto do Miocárdio
ICBS	.....	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IP-GTT	.....	Teste de Tolerância a Glicose Intrapertoneal
IP-ITT	.....	Teste de Tolerância a Insulina Intrapertoneal
IPM VD	.....	Índice de Performance Miocárdica Ventricular Direita
IPM VE	.....	Índice de Performance Miocárdica Ventricular Esquerda
KO-LDLr <sup>-/-</sup>	.....	<i>knockout</i> para o receptores de LDL
FisCel	.....	Laboratório de Fisiologia Celular
LDL	.....	Lipoproteína de Densidade Baixa
LDLox	.....	Lipoproteína de Densidade Baixa Oxidada
LDLr <sup>-/-</sup>	.....	Knockout do Receptor de LDL
LLP	.....	Lipase Lipoprotéica
LPO	.....	Lipoperoxidação

LT	.....	Leucotrienos
LXs	.....	Lipoxinas
MCP-1	.....	Proteína Quimiotática de Monócito 1
MCSF	.....	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
NF-κB	.....	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NO <sub>x</sub> <sup>-</sup>	.....	Nitrato e Nitrito Totais
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	.....	Nitratos
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	.....	Nitritos
NO	.....	Óxido Nítrico
KO-LDLr	.....	Nocaute para receptores de LDL
OMS	.....	Organização Mundial da Saúde
OPG	.....	Osteoprotegerina
OGM	.....	Organismos Geneticamente Modificados
PGA <sub>2</sub>	.....	Prostaglandina A da série 2
PGE	.....	Prostaglandinas da Série E
PGE <sub>2</sub>	.....	Prostaglandina E da série 2
PGG <sub>2</sub>	.....	Prostaglandina G da série 2
PGH <sub>2</sub>	.....	Prostaglandina H da série 2
PGI	.....	Prostaciclina
PGs	.....	Prostaglandinas
PKC	.....	Proteínas Quinase C
POF	.....	Pesquisa de Orçamento Familiar
HSP27	.....	Proteína de Choque Térmico de 27 kDa

HSP70	.....	Proteína de Choque Térmico 70 kDa
HSP72	.....	Proteína de Choque Térmico de 72 kDa
SIRT-1	.....	Proteína Desacetilase NAD-dependente SIRTUNA – 1
HSF1	.....	Proteína do Fator de Choque Térmico – 1
PUFAs	.....	Ácidos Graxos Poli-insaturados
RLs	.....	Radicais Livres
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	.....	Relação Nitratos e Nitritos
RIP1	.....	Proteína de Interação com o Receptor
RNA	.....	Ácido Ribonucleico
TBARS	.....	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
T/RD ratio	.....	Relação Espessura / Raio em Diástole
T/RS ratio	.....	Relação Espessura / Raio em Sístole
TAK1	.....	Fator de Crescimento Transformante Beta 1
TAP	.....	Tempo de Aceleração Pulmonar
TAP/TEP	.....	Relação Aceleração/Ejeção Pulmonar
TDM	.....	Tempo de Desaceleração da Onda E Mitral
TEA	.....	Tempo de Ejeção Aórtico
TEM	.....	Tempo de Ejeção Mitral
TEP	.....	Tempo de Ejeção Pulmonar
TFM	.....	Tempo de Fechamento Mitral
TFxM	.....	Tempo de Fluxo Mitral

TG	.....	Triglicerídeos
TNF- $\alpha$	.....	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRADD	.....	Proteínas de Domínio de Morte Celular Associada ao TNF
TRAF <sub>2</sub>	.....	Fator Associado ao Receptor de TNF
TX	.....	Tramboxanas
UFRGS	.....	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VCAM-1	.....	Moléculas de Adesão Celular Vascular 1
VEA	.....	Volume de Ejeção Aórtico
VLDL	.....	Lipoproteína de Densidade Muito Baixa
VTI AO	.....	Integral da Curva Aórtica de Velocidade Tempo
VTI PM	.....	Integral da Curva Pulmonar de Velocidade Tempo

# **Introdução**

A decorative flourish consisting of symmetrical, flowing lines that curve upwards and outwards from the center of the word 'Introdução', resembling a stylized scroll or scrollwork.

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das sociedades modernas e a produção de alimentos em larga escala, adito às altas ingestões calóricas, principalmente em países industrializados, vem produzindo desequilíbrios dietéticos sérios, como o consumo de grandes quantidades de carboidratos e lipídios. Estas mudanças dietéticas trazem diversas consequências para a saúde das populações, principalmente doenças cardiovasculares (DCV), que estão entre as mais importantes causas de óbitos em adultos, com uma incidência que continua a aumentar. Os acidentes vasculares cerebrais (AVC), que são causados, dentre outros fatores, pela aterosclerose, afetam cerca de 4 em cada 1.000 pessoas, e são a terceira causa de morte em países desenvolvidos (GILES e ROTHWELL, 2008; LIBBY *et al.*, 2011).

A aterosclerose é hoje considerada uma "doença sistêmica" caracterizada por lesões arteriais inflamatórias de baixo grau, que se desenvolvem através da progressão da doença (MONTECUCCO & MACH, 2009). Em condições fisiológicas, as células endoteliais sintetizam e liberam quantidades adequadas de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGs), tais como PG da série E (PGE<sub>2</sub> e PGE<sub>3</sub>), e mantêm um equilíbrio entre as moléculas jusantes pró e anti-inflamatórias. A secreção destas moléculas está implicada na defesa e manutenção da quiescência da parede vascular (MADRIGAL-MATUTE *et al.*, 2011). Contudo, na presença da aterosclerose, este equilíbrio rompe conducentemente devido a um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 1, 2, e 6 (IL- 1, 2, e 6) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), com posterior progressão da doença (TABAS, 2010; HARVEY e FERRIER 2012).

Citocinas pró-inflamatórias podem induzir o estresse oxidativo, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por monócitos, macrófagos e leucócitos, esse efeito somado ao *shear stress* (estresse de cisalhamento) e a ativadores de proteínas quinase C (PKC), levam à ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), responsável por desencadear processos de proliferação celular nas células endoteliais e nas células musculares lisas nas regiões de lesões arteriais (DESSI *et al.*, 2013). Entretanto, as PG

podem promover a produção de imunoglobulinas E por linfócitos B, e também podem agir como um potente anti-inflamatório, bloqueando a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (CALDER, 2008a e b; GEWIRTZ *et al.*, 2001; VACHIER *et al.*, 2002; ROSSI *et al.*, 2000).

As PGs apresentam uma gama de possibilidades (atividades) fisiológicas, por constituírem uma grande família de autacoides, ou seja, substâncias endógenas com perfil hormonal de efeito local. O trabalho desenvolvido por HOMEM DE BITTENCOURT *et al.*, (2007) demonstrou que determinadas prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) agem contra a formação da placa aterosclerótica, relatando que essas CP-PGs podem reverter as lesões arteriais em camundongos adultos nocaute (*knockout*) para receptores de LDL (KO-LDLr<sup>-/-</sup>), quando alimentados durante 4 meses somente com uma dieta hiperlipídica. Segundo os autores, as CP-PGs modulam o estado redox e redirecionam o metabolismo lipídico celular de forma a impedir o acúmulo de lípidos.

As CP-PGs são também indutoras da síntese de proteínas de choque térmico - HSP (do inglês *Heat Shock Protein*), o que lhes confere um caráter citoprotetor, por promoverem a ativação de fatores de choque térmico - HSF (do inglês *heat shock factors*), fatores nucleares que ativam a via das HSPs, que são citoprotetoras já que impedem a desnaturação de proteínas intracelulares e “desligam” o fator nuclear NF- $\kappa$ B, que é um dos principais envolvidos na doença inflamatória vascular da aterosclerose (CALDER, 2008a e b; CALDERWOOD & XIAO, 2007). Desta forma, nosso principal objetivo é investigar através dos conhecimentos dos mecanismos fisiológicos, o efeito direto da expressão de HSPs via choque térmico, no processo inflamatório da aterosclerose, pelo método de “*hot tub*” em camundongos machos nocaute para o receptor de LDL (KO-LDLr), em dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica.

# **Objetivos**

---



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Considerando-se que a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica dos vasos sanguíneos e que as proteínas de choque térmico apresentam caráter anti-inflamatório, o presente estudo teve por objetivo investigar o efeito crônico direto da expressão de HSPs, via choque térmico, no processo inflamatório da aterosclerose, pelo método de “*hot tub*” em camundongos machos nocaute para receptores LDL (KO-LDLr) submetidos à dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade cardíaca de fluxo aórtico, resistência vascular e fluxo mitral por ecografia Doppler modo-M;
- Acompanhar a resposta glicídica frente ao desafio no teste de tolerância à glicose (GTT) e na sobrecarga insulínica (ITT).
- Medir parâmetros bioquímicos (glicemia, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídeos, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS e nitratos/nitritos);
- Verificar a expressão proteica arterial, por western blotting, de HSP70, HSP72, HSP27, VCAM-1, SIRT1 e HSF1.
- Calcular a área de lesão aórtica por análise macroscópica das regiões ateroscleróticas evidenciados por Scarlat R (Oil Red O).

# **Literatura**

A decorative flourish consisting of symmetrical, flowing lines that curve upwards and outwards from the center, resembling a stylized diamond or a calligraphic ornament.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Doenças Cardiovasculares e Dislipidemias

No quadro atual, mundialmente falando, as doenças cardiovasculares (DCV) estão entre as principais causas de morte entre homens e mulheres acima de 40 anos, chegando a quase 60% dos óbitos ocorridos na população Norte Americana (ROSAMOND *et al.*, 2008; ROBINSON *et al.*, 2009). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 17 milhões de pessoas morreram por complicações circulatórias em 2011, estes dados epidemiológicos se assemelham aos de países em desenvolvimento como o Brasil onde as DCV são responsáveis por cerca de 20% de todas as mortes em indivíduos acima de 30 anos, e principalmente, aos estados com maior desenvolvimento humano, como o Rio Grande do Sul refletindo muito mais um aspecto de vida do que hereditário, ou seja, hábitos alimentares como a alta ingestão calórica e rica em ácidos graxos saturados (AGS), que estão relacionados com DCV e principalmente com os processos geradores da aterosclerose (LEE *et al.*, 2009; TABAS, 2010; LIBBY *et al.*, 2011).

Nas regiões economicamente mais desenvolvidas (Sul, Sudeste e Centro- Oeste) e, de modo geral, no meio urbano e entre famílias com maior renda, existe consumo elevado de gorduras, em especial as saturadas, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, (2014). Dados atuais do instituto apontam ainda, contínuos aumentos na prevalência do excesso de peso e da obesidade entre homens em todas as regiões brasileiras, aumento este que ascende desde a década de 80.

Segundo as Diretrizes Brasileiras sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular – DCGSC (2013), as Pesquisas de Orçamentos Familiares – POF apresentaram uma elevação no consumo de alimentos seguido por um aumento na proporção de alimentos industrializados, como pães (de 5,7% para 6,4%), embutidos (de 1,78% para 2,2%), biscoitos (de 3,1% para 3,4%), refrigerantes (de 1,5% para 1,8%) e refeições prontas (de 3,3% para 4,6%) no período de 2008-2009 quando comparada à mesma pesquisa realizada em 2002-2003. As POF revelaram que, quanto à distribuição de macronutrientes, o perfil

atual é estimado em valores percentuais de 59 para calorias representando os carboidratos; 12%, para proteínas; e 29%, para lipídeos.

As dietas ricas em lipídios, principalmente AGS, estão fortemente associadas a alterações das frações lipídicas circulantes, essas frações compreendem lipoproteínas constituídas de um núcleo de triglicérides (TG) e de éster de colesterol rodeado por uma camada externa composta de colesterol livre (não esterificados), fosfolípidos e vários componentes proteicos (Figura 1). São um complexo lípido/proteico que assim empacotadas facilmente são transportadas através da circulação, vez que lipídios são insolúveis em água (LUSIS & PAJUKANTA, 2008).

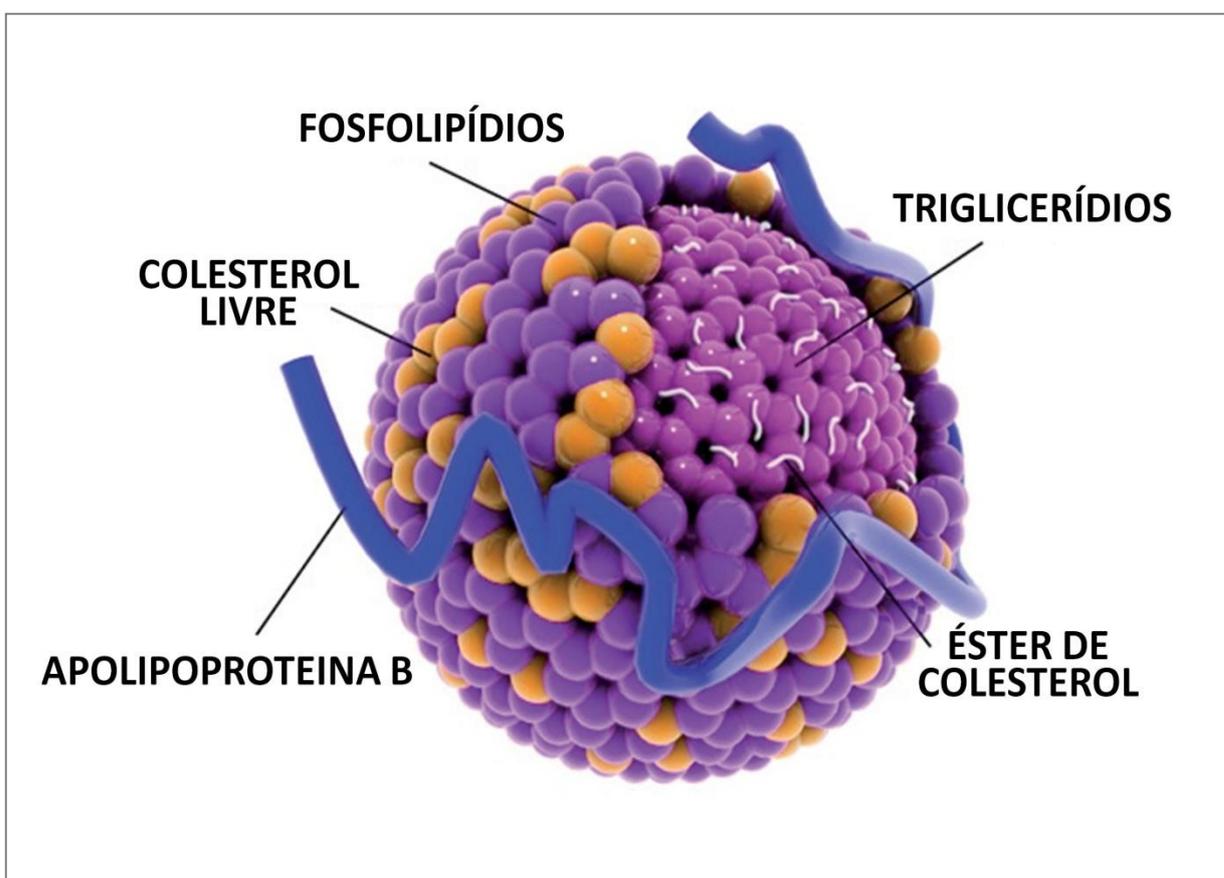


Figura 1. **Esquema estrutural de uma lipoproteína plasmática.** Os lipídios são insolúveis em água por natureza e têm de ser transportadas em fluidos corporais na forma de complexos lípidios/proteína, ou seja, lipoproteínas. Lipoproteínas consistem de um núcleo lipídico de triglicéridos e ésteres de colesterol, e uma superfície anfifílica de colesterol livre e fosfolípidos. Figura adaptada de Frank & Kostner, LIPOPROTEINS – ROLE IN HEALTH AND DISEASES (2012).

Nas dislipidemias as alterações lipêmicas, observadas geralmente em obesos, são altamente aterogênicas e os padrões mais frequentes são as elevações dos níveis de lipoproteínas de densidade baixa (LDL), e dos níveis de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) acompanhada pela redução dos níveis de lipoproteínas de densidade alta (HDL) (LIBBY *et al.*, 2011). No quadro aterogênico as LDLs estão presentes em grandes proporções e a hiperprodução de VLDL por aumento do fornecimento de ácidos graxos livres (AGLs) ao fígado, como integrante do quadro de obesidade, é creditada como causa principal (BATTERIDGE, 1997; LAMARCHE *et al.*, 1997).

As dislipidemias são classificadas de acordo com as alterações das frações lipídicas que se encontram modificadas, sendo assim denominado de hipercolesterolemia isolada (colesterol total  $\geq 240$  mg/dL), mista (colesterol total  $\geq 240$  mg/dL e triglicérides  $\geq 150$  mg/dL), hipertrigliceridemia isolada (triglicérides  $\geq 150$  mg/dL), hipoalfalipoproteinemia isolada (colesterol HDL circulante  $< 40$  mg/dL) e associada com aumento do colesterol e/ou triglicérides (DCGSC, 2013). O desbalanço lipídico tem relação direta com alterações dos níveis de insulina, com o percentual de gordura corporal e com a síndrome metabólica (DESSI, *et al.*, 2013).

Alterações nos níveis de lipídios circulantes podem ser agravadas pela resistência à insulina e representam um fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular aterosclerótica, a falta de sinalização de insulina apropriada especialmente em tecidos periféricos, tais como as células adiposas, resulta no metabolismo anormal de lipídios que produzem consistentemente o fenótipo pró-aterogênico (SEMENKOVICH, 2006). Os níveis de AGLs circulantes acrescem o fornecimento, em excesso, de lipídios resultando no aumento da secreção de partículas de VLDL, o VLDL é metabolizado em lipoproteínas remanescentes e LDL, que é fortemente associada ao risco de aterosclerose (DESSI, *et al.*, 2013).

Outra doença cardiovascular, a hipercolesterolemia familiar, é uma condição hereditária dominante que resulta em níveis elevados de colesterol total e de LDL, resultando em infartos do miocárdio (IM) em idade prematura, a principal manifestação clínica é um distúrbio aterosclerótico cardiovascular acelerado. A doença é caracterizada pela elevação do colesterol no soro, estando em uma faixa de 300-600 mg/dL com uma elevada taxa de lipoproteínas de baixa densidade, normalmente maior do que 200 mg/dL (DCGSC, 2013).

Os riscos de doença aterosclerótica aumentam progressivamente com a elevação dos níveis de colesterol LDL estando inversamente relacionada aos níveis de colesterol HDL, as lesões ao endotélio (intima arterial) e ao músculo liso subjacente são causadas pelas LDLs, especialmente na forma oxidada ou glicosilada (como no *diabetes mellitus*), após sua migração pelo endotélio e internalização por macrófagos desencadeando uma cascata inflamatória responsável pela progressão da lesão vascular (HANSSON, *et al.*, 2006). Em sumo a aterosclerose é uma doença cardiovascular que se caracteriza pelo acúmulo de lípidos nas paredes da artéria, que podem levar à obstrução da passagem do sangue (DESSI, *et al.*, 2013).

### 3.2 Dislipidemias e a Gênese da Aterosclerose

As dislipidemias aterogênicas envolvem anormalidades no metabolismo das lipoproteínas, onde o desbalanço lipídico que inclui elevações dos níveis de VLDL e LDL, e baixos níveis de HDL, geralmente ocorrendo juntas, devida sua base metabólica comum, que envolvem duas vias que dependem principalmente da fonte de lipídios circulantes, dietética (exógena) ou hepática (endógena) (TOMKIN, 2010). A gordura da dieta e o colesterol são absorvidos e empacotados pelos enterócitos do intestino delgado, e segregados para os vasos linfáticos como quilomicrons, grandes partículas de lipoproteínas ricas em TG (Figura 2), que entram na corrente sanguínea pela veia subclávia esquerda. O termo "aterogênica" é aplicado a esta forma de dislipidemia, porque ocorre frequentemente em pacientes com DCV prematura (DALLINGA-THIE *et al.*, 2010).

Na circulação, ácidos graxos (AG) são extraídos das partículas de quilomicron por células periféricas através da ação da enzima lipase lipoprotéica (LLP), deixando menor e mais densa estas lipoproteínas (PRASSL & LAGGNER, 2012). Os remanescentes de quilomicrons são internalizados pelo fígado, que sintetiza também colesterol e TG e reempacota estas lipoproteínas em partículas de densidade muito baixa, lipoproteínas (VLDL) (LEE & CHOUDHURY, 2010). Na circulação mais uma vez, os tecidos periféricos podem

tomar o que eles exigem da constituição das VLDL que são remodeladas em lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), e finalmente as mais densas, partículas de LDL ricas em colesterol (Figura 2) (PRASSL & LAGGNER, 2012).

Lipoproteínas de alta densidade, partículas de HDLs, podem mediar um processo conhecido como o transporte reverso de colesterol, em que as frações de HDL adquirem o colesterol dos tecidos periféricos, assim como a partir de VLDL e LDL circulantes e transportá-los de volta para o fígado (Figura 2) (VAN DER VELDE, 2010; LEE & CHOUDHURY, 2010). Daí sua importância no ateroma, a fim de mediar este mesmo processo em placas ateroscleróticas, removendo o colesterol e gordura da parede da artéria e retornando-a para o fígado (PRASSL & LAGGNER, 2012).

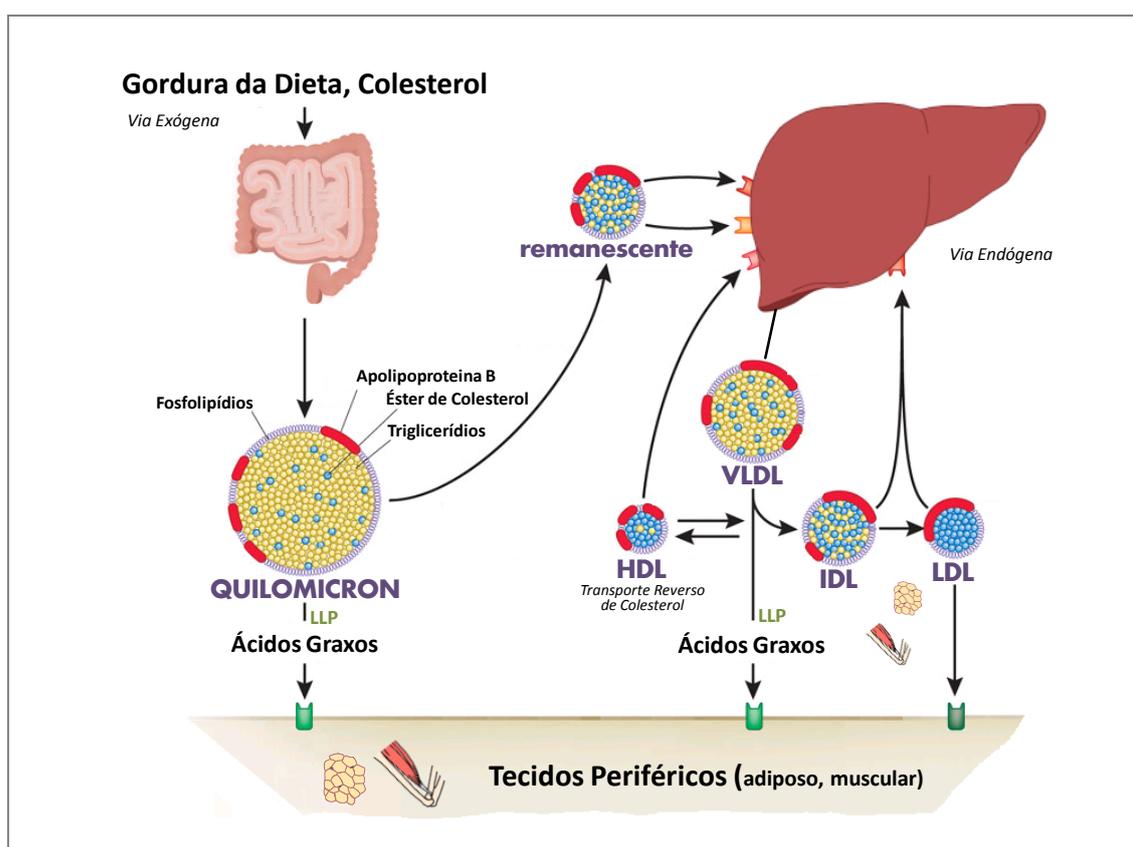


Figura 2. **Metabolismo normal das lipoproteínas.** Lipoproteínas ricas em triglicérides (TGs) são secretadas pelo intestino (quilomícrons - via exógena) sofrem lipólise na circulação por ação da enzima lipase lipoprotéica (LPL) proporcionando ácidos graxos aos tecidos. Remanescentes de quilomícrons são levados para o fígado que sintetizam triglicérides e empacota moléculas de VLDL (via endógena). As VLDL são metabolizadas em IDL pela quebra dos TGs á ácidos graxos pela LLP, formando LDL, partículas mais ricas em colesterol. HDL formado na circulação é intrincado no transporte reverso de colesterol, envolvendo a troca de colesterol e apolipoproteínas de partículas de VLDL e IDL para seu retorno ao fígado. Figura adaptada de Lusic & Pajukanta, Nature Genética (2008).

Entretanto, nas dislipidemias, o baixo nível de HDL acompanhado pela elevação dos níveis de LDL predispõem estas lipoproteínas a um maior tempo de circulação na corrente sanguínea, que resultam frequentemente na oxidação destas moléculas (MCNAMARA, *et al.*, 1996). As LDL oxidadas (LDLox) representam um importante determinante do risco de aterosclerose, esta conformação da lipoproteína é altamente invasiva e se deposita na camada íntima arterial em injúria, a deposição é acompanhada pela liberação de citocinas que atraem para o local da lesão monócitos, o que caracteriza um perfil inflamatório (PACKARD & LIBBY, 2008; MONTECUCCO & MACH, 2009).

O endotélio normal participa de modo essencial na regulação do tônus vascular, e na resposta inflamatória, produtos normais de um sistema vascular saudável como espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO), formados como um produto do metabolismo do oxigênio, estão envolvidos na sinalização intracelular e na geração de ATP em todas as células (GAUTHIER *et al.*, 1995). O NO inibe a adesão leucocitária ao endotélio, evita a proliferação das células musculares lisas vasculares (CMLV) protegendo contra a lesão vascular (inflamação) e limita a agregação plaquetária, efeito antitrombótico (STARY *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 2009). Durante a gênese do ateroma ocorre uma diminuição na produção do NO e a ausência de sinais de alerta resulta em desfechos frequentemente catastróficos (VENTURINELLI *et al.*, 2006; TOTH, 2008).

Entretanto, vários fatores, incluindo a inflamação, aumentam drasticamente a produção de EROs, como o superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxila (OH), eles reagem também com o NO para produzir peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) outra ERO prejudicial. Estas moléculas danificam lipídios, proteínas, RNA e DNA, e transformam o LDL para a sua forma mais letal, o LDLox, aumentando o perfil inflamatório pela deposição contínua no endotélio vascular (MORRELL, 2008). O aumento de EROs oxidam fosfolípidos na superfície das partículas de LDL que, posteriormente, servem como alvos para os receptores de reconhecimento, em especial, receptores scavenger (GAUTHIER *et al.*, 1995; MORRELL, 2008).

Os fosfolípidos oxidados (FLox) iniciam e modulam muitos dos eventos celulares observados no desenvolvimento da deposição da camada de gordura (ateroma) na íntima arterial. Misturas complexas de FLox induzem uma resposta inflamatória pela indução de genes pró-inflamatórios como proteínas quimiotáticas de monócitos - 1 (MCP-1) e

interleucina-8 (IL-8) (VOGIATZI *et al.*, 2009). Nas células endoteliais, FLox alteram a expressão de genes relacionados com a angiogênese, a inflamação, a cicatrização e a própria aterosclerose, além de ativar plaquetas, induzindo aderência e diferenciação de monócitos e promovem a diferenciação de células musculares lisas relacionados com os processos de formação das placas. Assim se estabelecendo um circuito de grandes proporções, onde inflamação gera inflamação durante a gênese da aterosclerose (DESSI, *et al.*, 2013). Embora o “primeiro evento” favorecendo a deposição lipídica dentro do espaço subendotelial (médica) não seja totalmente claro, a infiltração de LDLox é considerado como o passo crucial na formação do ateroma (LIBBY *et al.*, 2011).

### 3.3 Inflamação e Aterosclerose

Durante as últimas décadas, as evidências mostraram que a aterosclerose é uma DCV progressiva, multifatorial, crônica e com uma longa fase assintomática (HOMEM DE BITTENCOURT *et al.*, 2007; ROBINSON *et al.*, 2009; LIBBY *et al.*, 2011), responsável por ocasionar IM e acidentes vasculares cerebrais (AVC) (TOTH, 2008). A gênese da aterosclerose envolve um sistema endócrino complexo de “uma conversa cruzada” entre sinalização parácrina e justácrina entre sistema imunológico e as células vasculares, bem como vários tecidos e órgãos, incluindo o coração, fígado, pâncreas, tecido adiposo, rim, adrenal, glândulas sexuais e hipófise (LIBBY, 2007). Assim, as placas são o “campo de batalha” entre uma desequilibrada resposta imune e o acúmulo de lipídios na camada íntima das artérias. (LIBBY *et al.*, 2011).

Anatomicamente as artérias apresentam três camadas bem distintas (Figura 3a): *túnica íntima*, camada mais interna, constituída por uma única camada de células endoteliais e uma lâmina subendotelial; a *túnica média*, rica em elastina e células musculares lisas que garante sua grande capacidade distensível; e a *túnica adventícia*, composta por tecidos conjuntivo frouxo com grandes quantidades de fibrócitos, mastócitos, fibras elásticas e colágeno (LACCHINI & IRIGOYEN, 2012). Os processos inflamatórios ocorrem na camada

mais interna, nas células endoteliais, e desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da aterosclerose, que ocorrem devido à deposição de lipoproteínas em sítios específicos da matriz subendotelial das artérias (processo proliferativo), as disfunções neste tecido aumentam a progressão da doença pela promoção destes mecanismos inflamatórios, através da presença de macrófagos, monócitos, linfócitos T e outras células em diferentes fases de formação e evolução da placa aterosclerótica (Figura 3b) (LUZ E LAURINDO, 2005).

A formação da placa inicialmente ocorre em locais onde o fluxo laminar sanguíneo está alterado, o que interfere no estresse de cisalhamento, e nas características normais do endotélio (GAUTHIER, et al; 1995). Na tentativa de reparo o endotélio atrai para as áreas lesionadas linfócitos T, monócitos e plaquetas, entretanto, uma vez tendo falho o processo reparador, o endotélio torna-se permeável e os linfócitos e monócitos migram para o fundo da camada íntima da artéria, onde uma série de reações ocorre nas partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LIBBY et. al., 2011). As LDL se acumulam e se alteram através de reações de oxidação e glicação na subíntima arterial, e liberam citocinas no plasma, estas citocinas atraem e são captadas por monócitos, que se diferenciam em distintos tipos de células inflamatórias, tais como células dendríticas, osteoclastos, células de osteoblasto e células de espumosas (Figura 3b). As células de espuma (*foam cells*), englobam partículas de LDLox, que são atraídas por receptores scavengers da célula fagocítica (LUZ E LAURINDO, 2005).

A diferenciação dos macrófagos compreende um processo modulado por diversas citocinas e fatores de crescimento (tais como o receptor ativador do fator nuclear kappa B [NF- $\kappa$ B]; osteoprotegerina [OPG], fator de necrose tumoral alfa [TNF- $\alpha$ ]; fator estimulador de colônias de macrófagos [MCSF]; e interleucina 4 [IL-4]) (MONTECUCCO & MACH, 2009; CAMPENHOUT & GOLLEDGE, 2010). As citocinas estimulam também a expressão, em células circulantes e no endotélio, de moléculas de adesão como as moléculas de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), responsáveis pela deposição de leucócitos sobre o endotélio, e sua penetração no espaço subendotelial (LIBBY et. al., 2011).

Ainda neste processo células musculares lisas vasculares (CMLV) começam a migrar da camada média para a túnica íntima (Figura 3c), em resposta a liberação de fatores de crescimento quimiotáticos e mitogênicos dos linfócitos e monócitos, perdendo seu caráter contrátil e diferencia-se em células com fenótipo secretor que proliferam, liberam fatores de

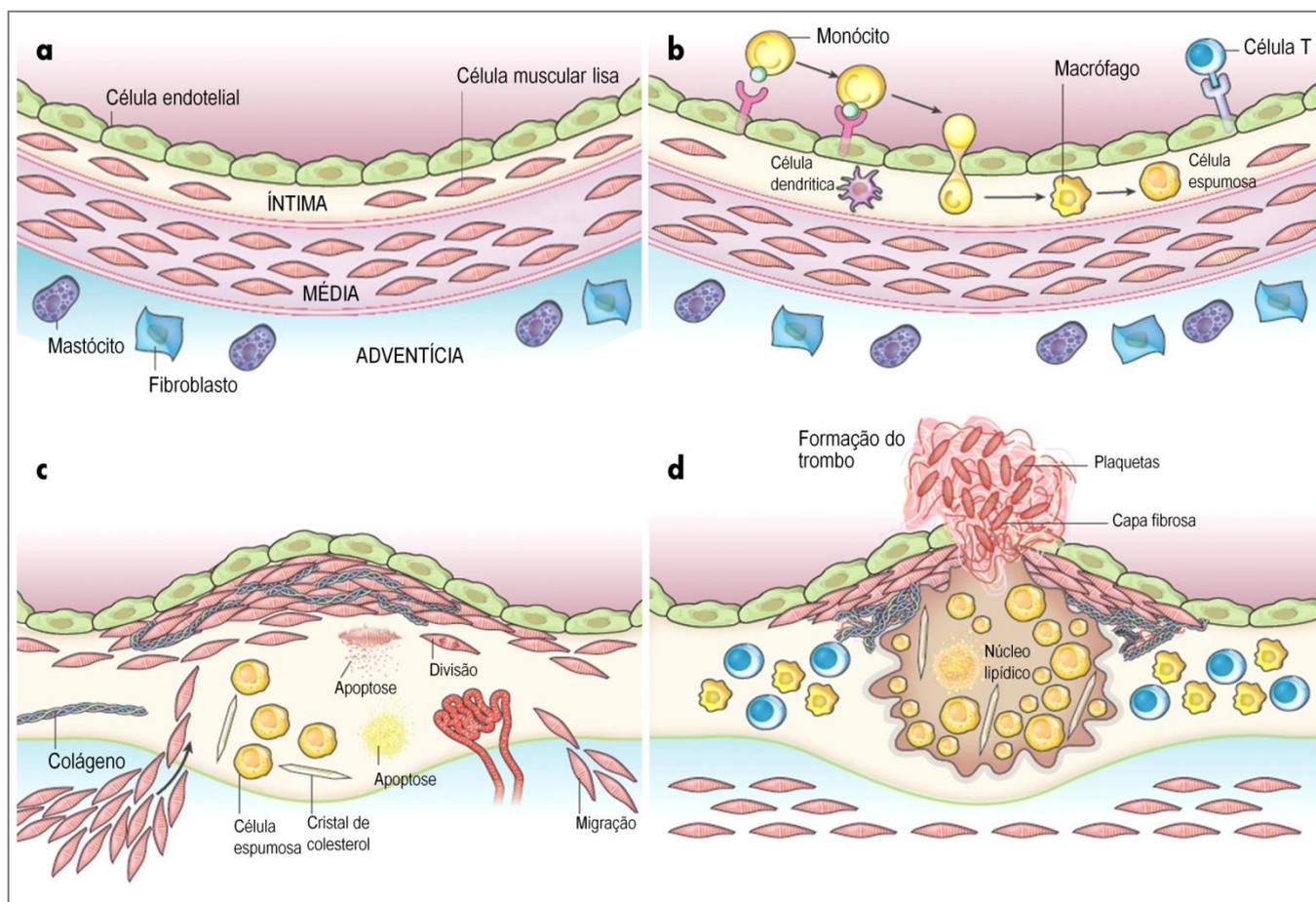
crescimento e componentes de matriz extracelular que associado a colágeno e proteoglicanos formam um tampão fibroso (LIBBY *et al.*, 2011). Estas células musculares lisas, ao migram para a íntima acabam por remodelar num processo irreversível as artérias, uma ação que pode causar estenose no lúmen arterial com deposição de colágeno e cálcio (DESSI, *et al.*, 2013).

Além disso, os macrófagos e monócitos envolvidos na reação inicial começam a morrer (processo apoptótico), resultando na formação de um núcleo necrótico na região central da lesão coberta pela capa fibrosa, enquanto que o colesterol liberado pelo processo apoptótico dos macrófagos se cristaliza na placa (GAUTHIER, *et al.*; 1995). Células inflamatórias e vasculares produzem mais quimiocinas para o recrutamento de linfócitos T na subintima, isto induz o círculo vicioso deletério da resposta inflamatória imune mediada pelos linfócitos Th1, células B, mastócitos e neutrófilos promotores do processo aterosclerótico (MONTECUCCO & MACH, 2009; DESSI, *et al.*, 2013). Desta forma, o que se vê no ateroma é um aumento em tamanho pelo continuo acumulo de LDL e leucócitos, a parede da artéria se expande ainda mais em direção à luz do vaso diminuindo o diâmetro interno, comprometendo totalmente o fluxo sanguíneo e causando a instabilização da placa (LUZ E LAURINDO, 2005).

Num processo continuum do ateroma, a liberação de mediadores tóxicos, tais como proteases e oxidantes pelas células imunológicas induzem a instabilidade da placa, a apoptose das CMLV ratificam a perda da integridade da placa e a capa fibrosa exhibe fissuras na superfície endotelial (Figura 3d), este acontecimento dramático faz com que o material pró-trombótico intraplaca composto de fragmentos lipídicos e restos celulares, sejam expostos ao fluxo de sangue que sob efeito dos agentes trombogênicos das plaquetas resultam na formação de trombos, a oclusão trombótica súbita da artéria no local da placa pode parar o fluxo de sangue e induzir uma crítica isquemia ao coração, cérebro e tecidos periféricos resultando em um IM, AVC e/ou morte (GAUTHIER, *et al.*, 1995).

Todo esse quadro de inflamação crônica da aterosclerose envolve uma série de moléculas bioativas como as já citadas citocinas que conduzem vias de sinalização ativadoras de várias famílias de proteínas quinases, que por sua vez acionam fatores de transcrição tais como NF- $\kappa$ B (HANSSON *et al.*, 2006). A ativação desses fatores de transcrição resulta feedback positivo que sustenta o processo inflamatório. Com o tempo, essas mudanças no perfil de expressão resultam em diferenciação celular que podem causar danos, alterações,

e/ou perda de função significativa dos tecidos (HANSSON *et al.*, 2006; PACKARD & LIBBY, 2008; TABAS, 2010).



**Figura 3. Estágios do desenvolvimento das lesões ateroscleróticas.** Neste esquema são demonstradas as alterações que ocorrem na musculatura normal das artérias durante a progressão da aterosclerose até a formação do trombo. a) A artéria normal contém três camadas. A camada interna, *túnica íntima*, revestida por uma monocamada de células endoteliais que está em contato com o sangue e recobre a membrana basal. A camada íntima humana apresenta também células musculares lisas residentes. A camada média ou *túnica média* contém células musculares embebidas numa matriz extracelular. A *adventícia*, a camada externa das artérias, contém mastócitos, fibroblastos, terminações nervosas e microvasos.; b) Os passos iniciais da aterosclerose incluem adesão de leucócitos do sangue na monocamada endotelial, a migração dos leucócitos para a íntima, a maturação dos monócitos (os mais numerosos dos leucócitos recrutados) em macrófagos, e a absorção de lipídios por estas células produzindo as células de espuma.; c) a progressão da lesão envolve a migração de células musculares lisas para a íntima, a proliferação de células musculares lisas da íntima e a síntese aumentada de macromoléculas da matriz extracelular, como o colágeno, a elastina e proteoglicanos. Macrófagos e células musculares da placa podem morrer (processo de apoptose) avançando a lesão. Lipídios e fragmentos celulares de células mortas podem acumular-se na região central da placa, formando o núcleo necrótico do ateroma. A placa avançada apresenta também cristais de colesterol formado pelos lipídios liberados, e a presença de microvasos.; d) A trombose, a complicação final da aterosclerose, gerada pela ruptura física da placa aterosclerótica. É mostrada uma fratura de cápsula fibrosa da placa, o que permite componentes de coagulação do sangue a entrar em contacto com os fatores de tecido e moléculas intraplaca, provocando o trombo que se estende para a luz do vaso, onde poderá impedir o fluxo de sangue. Figura adaptada de Libby, Ridker & Hansson, Nature (2011).

### 3.4 Prostaglandinas, NF- $\kappa$ B e Heat Shock Proteins na Aterosclerose

As moléculas bioativas envolvidas nos processos inflamatórios como na aterosclerose incluem também prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), tromboxanas (TXs), leucotrienos (LTs), entre outros (CALDER, 2008a e 2009), estas moléculas sinalizadoras são produzidas a partir de eicosanoides, como o ácido araquidônico (AA/ 20:4- $\Delta^{5, 8, 11, 14}$ / ômega-6 ou n-6), que são derivados do ácido linoleico (18:2- $\Delta^{9, 12}$ / ômega-6 ou n-6), estes ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são essenciais e têm papel estrutural importante como componentes de membrana com os fosfolipídios (CURI & HOMEM DE BITTENCOURT, 2001). Os PUFAs são essenciais porque as células de mamíferos não apresentam enzimas que catalisam a inserção das duplas ligações além do carbono nove (C-9) na cadeia de AGs (ROSAMOND *et. al.*, 2008) e por esta razão eles devem estar presentes na dieta (ROSSI *et. al.*, 2000).

Dentre as moléculas bioativas, as PGs apresentam um papel central, não só pela diversidade estrutural, mas pela variedade de atuação em mecanismos fisiológicos (CALDER, 2008a e 2009). Inicialmente identificadas em secreções da próstata na década de 30, as PGs são sintetizadas em vários tecidos e órgãos, como, por exemplo, vesículas seminais, rins e no endotélio dos vasos (HARVEY e FERRIER 2012). A síntese de PGs, dentro do metabolismo de AGs, é um dos processos mais estudados e conhecidos, não só pela importância dos efeitos fisiológicos, mas também pelas aplicações médicas e farmacêuticas. As PGs são produzidas em resposta a vários estímulos, incluindo lesões e infecções, a partir da liberação do AA dos fosfolipídios ligados a membrana, reação catalisada pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (HOMEM DE BITTENCOURT *et. al.*, 2007).

As prostaglandinas constituem uma grande família de autacóides, substâncias endógenas com caráter de “hormônio de ação local”, de ocorrência natural em todos os tecidos de mamíferos. Muitas prostaglandinas têm participação fisiológica importante na redução da pressão arterial e homeostase cardiovascular. Um exemplo disso são as Prostaglandinas Ciclopentenônicas (CP-PGs), que apresentam importante potencial para o tratamento de doenças cardíacas (HOMEM DE BITTENCOURT *et. al.*, 2007).

Prostaglandinas CP-PGs como as prostaglandinas A da série 2 (PGA<sub>2</sub>), são de grande interesse cardiovascular uma vez que sua principal ação esta relacionada com a citoproteção (através da resposta celular ao estresse), apresentando atividade antiproliferativa (SIMPOSOS *et. al.*, 1998). Na aterosclerose, uma das primeiras respostas do endotélio a estímulos aterogênicos é a produção de PGs, que respondem bloqueando o processo de divisão celular no endotélio lesado, além de induzir a expressão de proteínas antioxidante e outras proteínas de estresse que conferem resistência as lesões de origem oxidativa (ROSSI e SANTORO, 1995).

O primeiro passo na síntese das PGs é a oxidação e ciclização do AA, com formação de um anel ciclopentano, para dar origem à prostaglandinas G da série 2 (PGG<sub>2</sub>) e prostaglandinas H da série 2 (PGH<sub>2</sub>), que são precursores de uma série de PGs e TXs. A catálise desta reação é feita pelo complexo prostaglandina endoperoxidase sintase, uma proteína microsomal que possui duas atividades catalíticas: ciclo-oxigenase (COX), a qual requer duas moléculas de O<sub>2</sub>, e peroxidase, a qual é dependente, em situações fisiológicas, de elétrons da própria cadeia polipeptídica da enzima, mas pode reagir também com glutathiona reduzida (HARVEY e FERRIER, 2012).

As COXs são enzimas-chave no metabolismo do AA e também na formação de um grupo importante de PGs (dezesseis tipos, aproximadamente, de PG da série 2) e TXs. Existem duas isoformas de COX: a *COX-1* uma enzima constitutiva e a *COX-2* induzida em células inflamatórias, como resultado da estimulação, e é responsável pela produção marcadamente elevada de PG que ocorre na ativação celular (LEE *et. al.*, 2009).

Em lesões ateroscleróticas há uma elevada expressão do gene da *COX-2*, sugerindo que a *COX-2* possa estar envolvida na patogênese desta desordem (D'AGOSTINO *et al.*, 2007). O gene que codifica a transcrição desta enzima é conhecido por estar sob o controle do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), que é ativado como resultado de uma cascata de sinalização desencadeada por processos inflamatórios e pela fosforilação de uma subunidade inibitória (inibidor do NF-κB, o IκB) que permite a translocação do dímero do NF-κB para o núcleo e, desta forma, possibilitando a transcrição destes genes envolvidos em processos inflamatórios (PIVA *et al.*, 2006).

O NF- $\kappa$ B faz parte de uma família de fatores de transcrição de células eucarióticas que regulam a expressão de uma grande variedade de genes que estão envolvidos em vários processos, como respostas inflamatórias e imunes, crescimento e desenvolvimento celular, e resposta ao estresse (BASSÈRES E BALDWIN, 2006). Este fator de transcrição é ativado em resposta a uma variedade de sinais que incluem citocinas (inflamação), agentes patógenos, lesões e outras condições de estresse. Em células não estimuladas, o NF- $\kappa$ B aparece ligado a uma proteína inibidora, I $\kappa$ B no citoplasma da célula, a conformação heterodimérica deste complexo mascara o sinal de localização nuclear do NF- $\kappa$ B, e impede que o NF- $\kappa$ B se ligue ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (Figura 4) (PIVA *et al.*, 2006).

A ativação da sinalização do NF- $\kappa$ B em resposta a inflamação como na aterosclerose é iniciada por estímulos extracelulares (citocinas, por exemplo). Estes estímulos são reconhecidos por receptores (Figura 4) e transmitidos para dentro da célula, onde proteínas de domínio de morte celular associada ao TNF (TRADD) ancoram, fornecendo uma plataforma dupla de montagem para o recrutamento da proteína Fas-associada ao domínio de morte celular (FADD) e ao fator associado ao receptor de TNF (TRAF2) (OECKINGHAUS, HAYDEN & GHOSH, 2011). Em conjunto TRAF2, integrado com o fator de crescimento transformante beta-1 quinase ativada (TAK1) e a proteína de interação com receptor (RIP1) culminando na ativação das I $\kappa$ B quinases (IKK) (OECKINGHAUS & GHOSH, 2009; NAPETSCHNIG & WU, 2013).

O complexo I $\kappa$ B quinase (Figura 4), consiste em duas subunidades catalíticas ativas alfa e beta (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ), e uma subunidade reguladora gama - IKK $\gamma$  (NEMO) (OECKINGHAUS, HAYDEN & GHOSH, 2011). As IKKs fosforilam a subunidade inibidora I $\kappa$ B do complexo I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B no citoplasma, levando o I $\kappa$ B para a degradação pelos proteossomas e liberando o NF- $\kappa$ B do complexo inibitório. As proteínas de NF- $\kappa$ B libertados migram para o núcleo, onde se ligam às suas sequências alvo  $\kappa$ B presentes nos promotores de virtualmente todas as proteínas induzíveis, responsáveis pelo disparo da inflamação ou de respostas imunológicas ativando, a transcrição gênica (CURI & HOMEM de BITTENCOURT, 2001; O'DEA & HOFFMANN, 2009; OECKINGHAUS & GHOSH, 2009; NAPETSCHNIG & WU, 2013).

Organismos vivos de modo geral respondem a desafios como a inflamação (pela elevação da temperatura corporal “febre”), bem como outras situações de estresse de

diferentes origens, através de um aumento da expressão dos genes das proteínas de choque térmico - HSPs (do inglês *Heat Shock Protein*) ou proteínas do estresse. Estas proteínas de choque térmico pertencem a um grupo de famílias altamente conservadas das proteínas expressas por todas as células e organismos desde bactérias a humanos em resposta a uma variedade de diferentes estímulos de estresse, incluindo metais pesados, citocinas inflamatórias, análogos de aminoácidos, estresse oxidativo e isquemia (MORIMOTO *et al.*, 1990). Elas são classificadas de acordo com seu peso molecular, variando de 10 a 110 quilodaltons (kDa) (MORIMOTO *et al.*, 1990; CALDERWOOD & XIAO, 2007).

HSPs são geralmente consideradas como moléculas de proteção contra diferentes tipos de estresse devido às inúmeras funções intracelulares, incluindo papéis como moléculas acompanhantes (chaperonas, do inglês *chaperon*), promovendo o enovelamento correto de proteínas recém-sintetizadas ou desnaturadas, inibindo a apoptose, ou mantendo a integridade celular pela estabilização do citoesqueleto (CALDERWOOD & XIAO, 2007). Vários elementos que participam na aterogênese tem um forte impacto na expressão de HSPs, deflagrando em consequente o aumento dos seus níveis celulares. As HSPs podem desempenhar um papel fundamental durante a formação da placa aterosclerótica, ao impedir a formação da capa fibrótica em torno dos macrófagos, onde nesta etapa, por interação com as proteínas do citoesqueleto, tais como a actina, as HSPs modificam e alteram a capacidade de migração e proliferação das CMLV (MADRIGAL-MATUTE *et al.*, 2011).

A expressão intracelular de HSPs também está associada a mecanismos antiapoptóticos e ações anti-inflamatórias por inibir a pró-produção de citocinas. A maior parte dos genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-8, possuem domínios  $\kappa$ B vinculados as suas regiões promotoras, suas transcrições são dependentes da ativação do NF- $\kappa$ B, que as HSPs inibem, impedindo a sua ativação e translocação ao núcleo celular (YOO *et al.*, 2000), assim modulam respostas imunológicas, processos inflamatórios, e fatores reguladores da sobrevivência celular e da apoptose (RAN *et al.*, 2004). O mecanismo pelo qual as HSPs inibem a ativação do NF- $\kappa$ B está associado à preservação e estabilização do I $\kappa$ B, através da ligação com a subunidade regulatória (IKK- $\gamma$ ) do complexo IKK, prevenindo a ativação das IKKs (YOO *et al.*, 2000; RAN *et al.*, 2004; CALDERWOOD & XIAO, 2007).

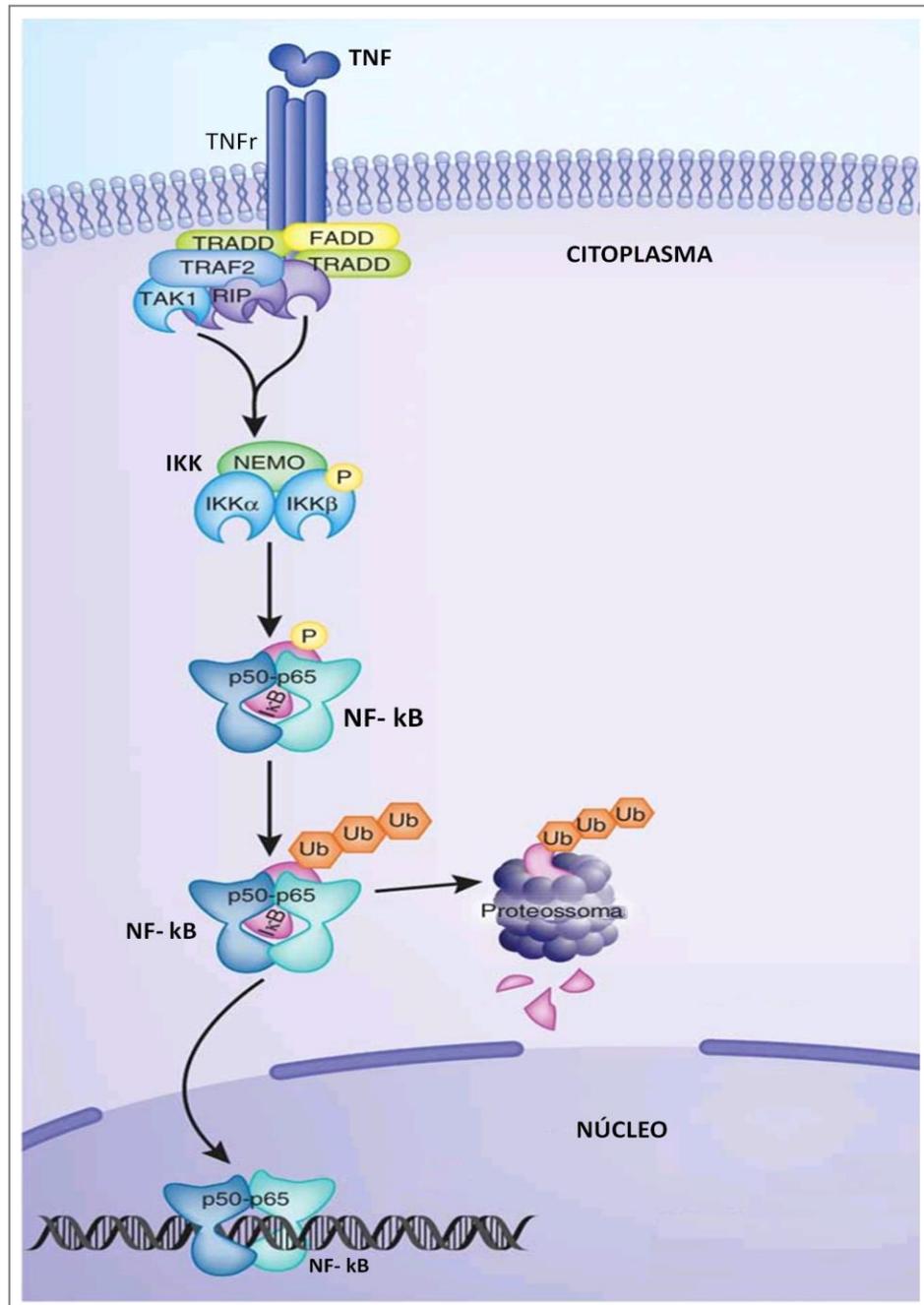


Figura 4. **Via clássica de ativação do NF-κB.** Em condições de repouso, os dímeros de NF-κB (subunidades p50 e p65) são ligados a proteínas IκB inibitórias, que sequestram o complexo NF-κB, mantendo-o inativo no citoplasma. A presença de citocinas do processo inflamatório da aterosclerose, como o fator de necrose tumoral (TNF) interagem com seu receptor (TNFr), na superfície da membrana celular, levando à ligação de proteínas de domínio de morte celular associada ao TNF (TRADD), fornecendo uma plataforma dupla de montagem para o recrutamento da proteína Fas-associada ao domínio de morte celular (FADD) e ao fator associado ao receptor de TNF (TRAF2). Em conjunto TRAF2, integrado com fator de crescimento transformante beta-1 quinase ativada (TAK1) e a proteína de interação com receptor (RIP1) ativam, por fosforilação, o complexo IκB quinase (IKK), que consiste de duas subunidades catalíticas ativas (IKKα e IKKβ), e uma subunidade reguladora IKKγ (NEMO). O complexo IKK fosforilado ativa a subunidade inibidora IκB do complexo IκB/NF-κB através de fosforilação. Proteínas IκB fosforiladas são ubiquitinadas e direcionadas para a degradação proteossomal, que assim, libera os heterodímeros de NF-κB para que eles possam translocar-se para o núcleo onde ligam-se as sequências alvo κB presentes nas proteínas induzíveis, responsáveis pelo disparo da inflamação ou de respostas imunológicas, ativando a transcrição gênica. Figura adaptada de Oeckinghaus, Hayden & Ghosh, Nature Immunology (2011).

O aumento da expressão e níveis de HSPs, no organismo, está também relacionado com eicosanoides como as PGs, envolvidas na modulação de intensidade e duração da resposta inflamatória. Prostaglandinas E da série 2 (PGE<sub>2</sub>), apresentam uma série de efeitos pró-inflamatórios, com a indução de febre, aumento da permeabilidade capilar e vasodilatação, além de potencializar a ação de outros agentes, tais como bradicinina e histamina. A PGE<sub>2</sub> suprime a proliferação de linfócitos, a atividade das células *natural killers* e inibe a produção de interleucina-2 (IL-2) e interferon gama (IFN $\gamma$ ), assim, nestes aspectos, PGE<sub>2</sub> é imunossupressora (CALDER, 2008a e b).

A PGE<sub>2</sub> também promove a produção de imunoglobulina E por linfócitos B (a imunoglobulina E é um mediador de inflamação alérgica) (CALDER, 2002, 2006, 2008a e b). Estudos recentes também demonstraram que a PGE<sub>2</sub> pode agir como um potente anti-inflamatório: a) inibindo a *5-lipoxigenase* e diminuindo a produção de LTs-4 (leucotrienos da série 4) inflamatórios; b) induzindo a enzima *15-lipoxigenase* e promovendo a formação de lipoxinas (LXs) que apresentam efeito anti-inflamatório (CALDER, 2008; GEWIRTZ et. al., 2001; VACHIER et. al., 2002); e c) inibindo diretamente a subunidade catalítica IKK $\beta$  do complexo IKK, bloqueando, assim, a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (ROSSI et. al., 2000).

Com essas premissas HOMEM DE BITTENCOURT e colaboradores (2007), demonstraram que as prostaglandinas ciclopentenônicas, como a PGA<sub>2</sub>, uma prostaglandina derivada da PGE<sub>2</sub>, podem agir contra a formação de placa aterosclerótica. Em seu trabalho utilizando camundongos machos adultos nocaute (*knockout*) para receptores de LDL (LDLr<sup>-/-</sup>), alimentados durante 4 meses somente com uma dieta hiperlipídica, morreram de infarto do miocárdio ou de acidente vascular cerebral, enquanto que os animais tratados com a mesma dieta e com *LipoCardium* (lipossomas com CP-PGs / 2 semanas), recuperaram-se completamente da lesão vascular, relatando que essas CP-PGs podem reverter as lesões ateroscleróticas.

As CP-PGs (PGA<sub>2</sub>), também são indutoras da síntese de proteínas de choque térmico, o que confere um caráter citoprotetor ao modular o estado redox e redirecionar o metabolismo lipídico celular de forma a impedir o acúmulo de lípidos. As CP-PGs promovem a ativação de heat shock factors (HSFs), fatores nucleares que ativam a via das HSP, que impedem a desnaturação de proteínas intracelulares e desligam o fator nuclear NF- $\kappa$ B, que é um dos

principais envolvidos na doença inflamatória vascular da aterosclerose (ROSSI e SANTORO, 1995). Portanto, a indução da expressão HSP, com consequente elevação do conteúdo intracelular desta proteína, representa um potencial fator citoprotetor e protetor do organismo (MEYER, 1999).

Tendo em vista a complexa relação entre NF- $\kappa$ B e as proteínas de choque térmico, vez que o NF- $\kappa$ B tem efeito pró-inflamatório ao induzir a expressão de citocinas inflamatórias, e a HSP, com ação anti-inflamatória por inibir a ativação do NF- $\kappa$ B, que controla a codificação e a transcrição do gene da *COX-2*, além de produzir um efeito anti-inflamatório direto (KNOWLTON, 2006), é pertinente inquirir sobre o efeito direto da elevação dos níveis de HSP através do aumento da temperatura corporal, por períodos prolongados, em organismos com um processo inflamatório vascular (aterosclerose) avançado. E assim o fizemos.

# **Métodos**

---



## **4. MÉTODOS E MATERIAIS**

### **4.1 Local de Realização dos Experimentos**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Celular – FisCel, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Localizado no campus central da UFRGS (Av. Sarmiento Leite n° 500, 2° andar, CEP 90050-170 Porto Alegre, RS).

### **4.2 Resalva Ética**

Todos os procedimentos desse estudo estavam de acordo com a Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais, instituído pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, e pelas Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA de 20 de setembro de 2013. As metodologias experimentais (manipulação e eutanásia) seguiram as normas éticas brasileiras, dos procedimentos e métodos adotados conforme a resolução N° 1000, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, de 11 de maio de 2012, Art. 4º do Capítulo I que estabelecem os princípios básicos norteadores destes procedimentos, assim como àquelas contidas nos Princípios Internacionais Orientadores para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais do Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS) (GOLDIM, 1997).

Embora desejável substituir a utilização de animais vivos nos procedimentos, por outros métodos que não impliquem a sua utilização, e tendo ciência de que o seu uso deve ser racional empregando o menor número de animais e, ao fazê-lo, diminuir ou eliminar o seu desconforto, até o momento da realização da pesquisa, não existiam métodos ou modelos validados para a substituição da metodologia empregada na pesquisa a que nos propomos. Neste sentido, o recurso à utilização de animais vivos fez-se necessária para proteger a saúde humana e animal.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, e encontra-se protocolado sob nº 25396 na Base de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS.

### **4.3 Estatística e Tamanho Amostral**

O número de animais para cada grupo experimental, em cada tipo de avaliação, foi a mínima indispensável para produzir o resultado conclusivo. Neste contexto, o tamanho das amostras foram calculadas para detectar a menor diferença esperada entre os grupos (de acordo com a literatura  $20 \pm 10$  ng/ml para a principal variável crítica do estudo, a expressão de HSP70 (CHUNG et al., 2008). Foi utilizado, para o cálculo, um poder estatístico de 80% para um nível de significância de  $p < 0,05$  e o software de Dimensionamento Amostral DIMAM 1.0 para Windows da Editora Guanabara Koogan considerou para esse parâmetro o número de sete (7) animais por grupo.

No total 101 animais foram utilizados, 59 para compor o grupo doente não tratado e 42 para o grupo doente submetido ao protocolo de choque térmico. Esse número foi necessário para suprir a demanda das análises histológicas vasculares, bioquímicas plasmáticas, análises teciduais via western blot (HSP70, HSP72, HSP27, VCAM-1, HSF1 e SIRT-1), análises macroscópicas da aorta e de parâmetros ecocardiovasculares.

Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) com teste *post hoc* de Tukey, para comparação da evolução do quadro clínico dos animais no grupo; Teste t-Student, para comparação do efeito do tratamento com choque térmico entre os grupos; Teste de Kaplan Meier seguido de hipótese de Mantel-Cox (Log-Rank), para análise de sobrevivência. Méritos do programa estatístico MINITAB 17.1 - *Pennsylvania State University* (2014).

#### 4.4 Animais Utilizados

Foram utilizados neste estudo 101 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem B6;129S7-Ldlr<sup>tm1Her</sup>/J nocaute para receptores de LDL (KO-LDLr), adultos (90 dias), machos de 10-14 g obtidos do Biotério Setorial de Camundongos do Departamento de Fisiologia, ICBS – UFRGS, mantido pelo Laboratório de Fisiologia Celular – FisCel. Os animais permaneceram em caixas de polipropileno (33x17x40 cm) em um ciclo de claro (iluminação artificial) /escuro de 12 h, temperatura de 25±2°C e umidade relativa do ar de aproximadamente 45%. Os animais receberam água e ração *ad libitum* durante todo período.

Os camundongos nocaute para receptores LDL, comprados do The Jackson Laboratories, foram obtidos por mutagênese química o que significa que, segundo a Lei de Biossegurança 11.105 de 24 de março de 2005, os mesmos não se enquadram na categoria de Organismos Geneticamente Modificados – OGM, conforme previsto no inciso I de seu Artigo 4º. Mesmo assim, e embora estes animais não se enquadrem como OGM conforme a legislação em vigor, nosso laboratório dispõe de Certificado de Qualidade em Biossegurança – CQB (Nº 0060/98) e está autorizado a trabalhar com OGM de classe II, sendo estes reproduzidos no biotério setorial.

#### 4.5 Modelo de Aterosclerose

Camundongos KO-LDLr, quando em dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica ao longo de 120 dias a partir da idade adulta, acumulam grandes quantidades de lipídios na circulação e conseqüentemente na parede dos vasos, que acabam se depositando e formando placas lipídicas na camada subendotelial, quadro clínico inflamatório característico da aterosclerose. Essa exposição à dieta ocorre com o animal já adulto, considerando para tanto o animal com idade de 90 dias.

Para validação do modelo animal experimental, a confirmação do *knockout* dos receptores de LDL, foi realizado, utilizando para tanto as glândulas adrenais de alguns animais. O resultado da imunodeteccção de LDLr, é demonstrado na Figura 5.

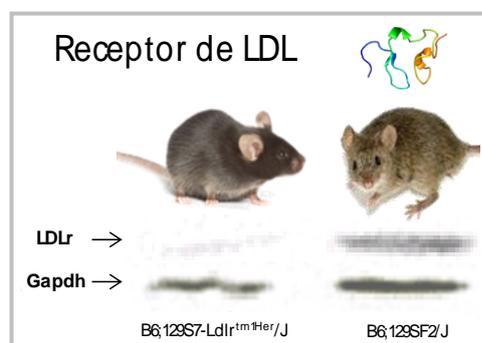


Figura 5. **Imunodeteccção de LDLr.** Representação gráfica da validação do modelo experimental. Animais B6;129S7-Ldlr<sup>tm1Her</sup>/J nocaute pra receptor de LDL e controle positivo B6;129SF<sub>2</sub>/J.

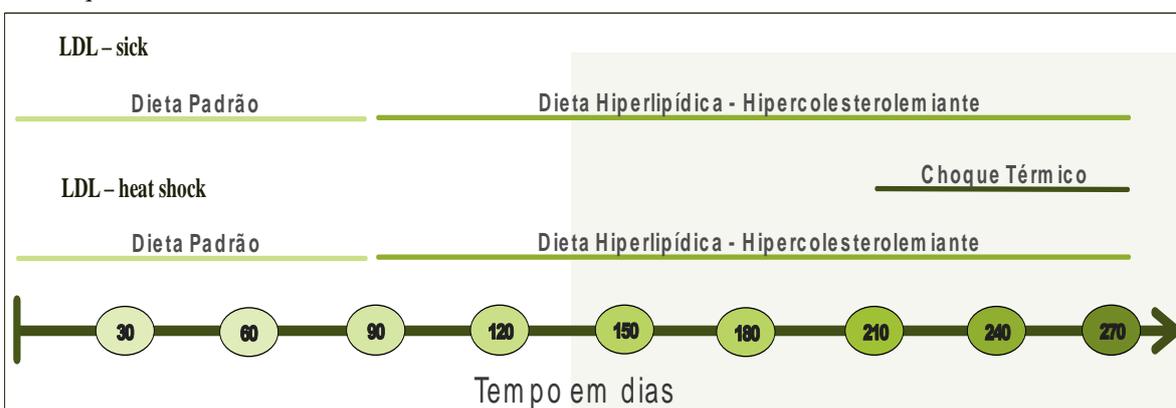
#### 4.6 Desenho Experimental

Os animais constituíram dois grupos experimentais, a saber: LDL – sick, que compreende camundongos doentes (aterosclerose) sem tratamento; e LDL – heat shock, grupo

experimental doente (aterosclerose), mas que recebeu intervenções de choque térmico semanais durante o 210-270° dia. Conforme apresentado no Quadro 1 (ver abaixo), os animais que constituíram ambos os grupos receberam até o nonagésimo dia de vida dieta padrão, (Nuvilab – CR1 16,6 kJ/g) contendo aproximadamente (em termos de peso relativo) 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos, o que corresponde a 62,8% das calorias na forma de carboidratos, 25,8% em proteínas e 11,4% em gorduras totais.

Ao ingressar no segundo trimestre do período experimental (91 dias), os animais passaram a ingerir uma dieta hiperlipídica e hipercolesterolemiantes aqui designada simplesmente de *high fat diet* (HFD). Essa nova dieta foi consumida pelos animais até o final dos procedimentos experimentais (270° dia), a dieta HFD continha (em termos de peso relativo) cerca de 34,3% de carboidratos, 22% de proteínas, 34,1% de gorduras e 1% de colesterol livre compreendendo 22,8 kJ/g sendo que 58% das calorias provinham de gorduras saturadas metabolizáveis, 16,4% de proteínas e 25,6% de carboidratos. Este é um modelo de desenvolvimento de aterosclerose amplamente utilizado e bem padronizado em nosso laboratório (HOMEM DE BITTENCOURT *et al.*, 2007).

Quadro 1. **Desenho experimental.** Esquema demonstrando os dois grupos experimentais: grupo doente aterosclerótico (LDL – sick) e grupo tratado com choque térmico (LDL – heat shock). Todos os animais têm uma dieta padrão até 90 dias de vida, sendo está substituída por uma dieta rica em lipídios e colesterol ingerida pelos animais até o fim dos procedimentos experimentais. Grupo LDL – heat shock realiza sessões de choque térmico semanais do 210-270° dia.



#### 4.7 Choque Térmico

Para o procedimento de choque térmico (*hot tub*), os animais (grupo LDL – heat shock) foram anestesiados com pentobarbital sódico 3% i.p. (10 mg para 100 g de camundongo; 3 µL/g de peso corpóreo, o que representa cerca de 60-70 µL por animal) com antecedência de dez minutos ao procedimento. A escolha do anestésico se baseia no fato do mesmo não causar alterações glicêmicas característicos da maior parte dos anestésicos em uso. A temperatura da sala para a realização do experimento foi monitorada e mantida a 27°C.

O controle da temperatura dos animais foi monitorada com termômetro retal (dimensões do eletrodo, 8 x 2 mm, em comprimento e diâmetro), durante todo o período em que os animais foram mantidos no banho térmico com água a 40°C. Após alcançar a temperatura retal de 41°C, os animais permaneceram no banho, com monitoramento contínuo da temperatura (41-41,7°C), durante 15 min. Durante o choque térmico os animais ficaram com as patas traseiras e cauda imersas na água, uma vez que especialmente a cauda determinava a regulação da temperatura perdendo calor na troca de temperatura com o ambiente. O procedimento utilizado é um modelo adaptado e padronizado em nosso laboratório, similar a Chung *et al.*, (2008).

Os animais ateroscleróticos (grupo LDL – sick), não submetidos ao choque térmico foram igualmente anestesiados (e tomados como controles experimentais), permanecendo à temperatura ambiente com sua temperatura corporal controlada, mantida entre 36,5-37,5°C, com auxílio de termômetro retal. Após o choque térmico e/ou anestesia os animais permaneceram no laboratório, até recuperação da anestesia, quando então foram reidratados com uma injeção subcutânea, na região dorsal (interescapular), de tampão fisiológico 0,9% (2 mL para cada 100 g de animal).

#### **4.8 Testes de Tolerância a Glicose e Insulina**

Os testes de tolerância à glicose (GTT) e a insulina (ITT) foram realizadas 72 horas após a última sessão de choque térmico do tratamento crônico de oito semanas, sem o uso de anestésicos. As medições foram realizadas no mesmo animal em diferentes tempos (0, 30, 60,

90 e 120 min) utilizando 5  $\mu$ L (cinco microlitros) de sangue retirados da porção distal da veia caudal.

#### 4.8.1 Teste de Tolerância IP-GTT

Para a realização do teste de tolerância a glicose foi preparada uma solução de glicose 80% (m/v) em 0,9% NaCl, administrada na concentração 1g/kg, por via intraperitoneal (IP-GTT). Para a obtenção da curva glicêmica, o valor da glicemia em jejum (12 horas) foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos (*tempo zero*) e nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose. As medidas da glicemia foram feitas com sangue total em punção na parte distal da cauda dos animais, usando aparelho de leitura glicêmica capilar, glicosímetro, *Optium Xceed da Abbott*.

Para o cálculo da área sob a curva (AUC), usada como um coadjuvante para a análise do teste de tolerância, possibilitando a comparação entre os grupos, utilizou-se o método de quadratura do trapézio (USA FAO, 1997). Assim a área sob a curva foi calculada pela lei de formação da integral de uma função no plano cartesiano, excluindo-se do cálculo as áreas abaixo da linha de jejum, conforme demonstrado na Figura 6.

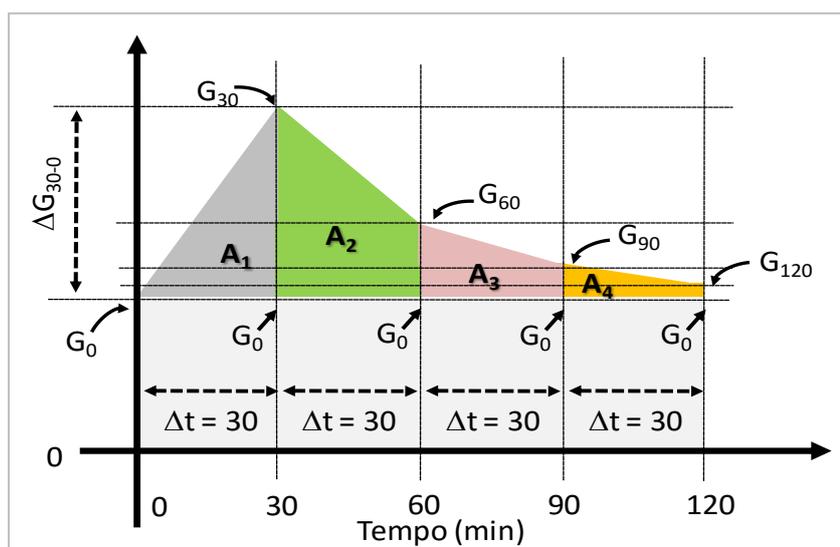


Figura 6. **Representação esquemática das formas geométricas formadas pela curva.**  $AUC/IAUC^* = A1+A2+A3+A4 = \{[30. (G_{30}+ G_{60}+ G_{90}) ]+ (15. G_{120}) - (105. G_0)\}$  (em min.mg/dL). Considerando o peso molecular da glicose, 180,16 mg/mmol, dividindo a AUC/IAUC (em min.mg/dL) por 18,016, obtém-se o valor em min.mM.

#### 4.8.2 Teste de Tolerância IP-ITT

Os testes de tolerância à insulina foram realizados com animais mantidos em jejum de 12 horas. Foi utilizada *Insulina Humalog Regular – Lilly* 100 UI/mL, preparada em PBS (NaCl (136,8 mM), KCl (2,7 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,9 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6,4 mM)) 1UI/mL, e aplicada na concentração de 0,75 UI/kg de peso corporal, por via intraperitoneal.

O valor da glicemia em jejum foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos (*tempo zero*) e novamente nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de insulina. As medidas da glicemia foram feitas com sangue total em punção na parte distal da cauda dos animais, usando aparelhos de leitura glicêmica capilar, glicosímetro, *Optium Xceed da Abbott*.

O cálculo da área incremental sob a curva (IAUC), usado na comparação entre os grupos, foi gerado pelo método de quadratura do trapézio (USA FAO, 1997), calculada geometricamente por meio da aplicação da regra trapezoidal, excluindo-se as áreas abaixo da linha de jejum (tempo zero), demonstrado esquematicamente na Figura 6.

#### 4.9 Análises Ecocardiográficas Doppler Pulsátil e Modo-M

As análises de fluxo aórtico, fluxo mitral e fluxo pulmonar, ocorreram por ecografia-doppler, exame não invasivo que utiliza os ultrassons de modo a adquirir informações sobre a anatomia, fisiologia e a patologia do sistema venoso e arterial superficial e profundo. Um total de três medidas compuseram os referidos dados, sendo a primeira realizada no 207° dia (72 horas antes do primeiro procedimento de choque térmico), a segunda no 243° dia e finalmente uma última avaliação após as oito semanas de tratamento.

O procedimento foi realizado com o aparelho Eco-Doppler / Philips – HD7 XE, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico 3% (10 mg para 100 g de camundongo), igualmente ao procedimento de choque térmico, para o exame os animais mantiveram um jejum de quatro horas e os pelos da região peitoral foram tricotomizados.

As análises foram realizadas com transdutor de 4-12 MHz em oito animais de cada grupo experimental. As aquisições de fluxo ecocardiográfico pulsátil foram realizadas em: Artéria pulmonar com ângulo do cursor Doppler em 0°, e constituíram dados de Tempo de Ejeção Pulmonar (TEP), Tempo de Aceleração Pulmonar (TAP), Relação Aceleração/Ejeção Pulmonar (TAP/TEP), Integral da Curva Pulmonar de Velocidade Tempo (VTI PM) e Índice de Performance Miocárdica Ventricular Direita (IPM VD) definida pela fórmula:

$$PMI\ VD: \frac{TFSL - TEP}{TEP}$$

Onde, TFSL indica o tempo de fechamento das semilunares pulmonar.

Folhetos valvares mitrais com ângulo do cursor a 60° para aquisição da amplitude da Onda E (E), Onda A (A), Relação E/A (E/A), Tempo de Fluxo Mitral (TFxM), Tempo de Fechamento Mitral (TFM), Tempo de Ejeção Mitral (TEM), Tempo de Desaceleração da Onda E Mitral (TDM) e Índice de Performance Miocárdica Ventricular Esquerda (IPM VE) aplicando a fórmula:

$$PMI\ VE: \frac{TFM - TEA}{TEA}$$

Onde TEA, representa o tempo de ejeção aórtico.

Aorta com ângulo do cursor Doppler em 60°, para Tempo de Ejeção Aórtico (TEA), Integral da Curva Aórtica de Velocidade Tempo (VTI AO), Frequência Cardíaca (FC):

$$FC\ bpm: \frac{60\text{seg.}}{\Delta t\ E \leftrightarrow E}$$

Onde o tempo em segundos (60) é dividido pelo intervalo de tempo entre duas ondas E.

Volume de Ejeção Aórtico (VEA):

$$VEA: \frac{\left(\frac{\sqrt{DAM}}{2}\right)^2 \cdot VTI_{AO} \cdot \pi}{1000}$$

Onde o volume de ejeção é determinado pela raiz do diâmetro arterial médio (DAM) dividido por dois e elevado ao expoente 2, multiplicado pelo VTI AO e pela constante  $\pi$  (= 3,1415) dividido por 1000.

Débito Cardíaco (DC):

$$DC: VEA \cdot FC$$

Aquisições de imagens unidimensionais (eco Modo-M) da primeira porção da aorta, foram usadas para constituírem dados de Diâmetro Arterial Diastólico (DAD), Diâmetro Arterial Sistólico (DAS), Diâmetro da Parede Arterial em Sístole (DPAS), Diâmetro da Parede Arterial em Diástole (DPAD), Relação Espessura/Raio em Sístole (T/RS ratio), Relação Espessura/Raio em Diástole (T/RD ratio), Índice de Distensibilidade Arterial (IDA):

$$IDA: DAS - DAD$$

e Índice de Distensibilidade da Parede Arterial (IDPA):

$$IDPA: DPAS - DPAD$$

As imagens e vídeos foram analisados e mensurados pelo programa RadiAnt DICOM Viewer.

#### 4.10 Acompanhamento de Parâmetros Metabólicos

Os animais semanalmente foram pesados para ajuste das doses do anestésico, e o consumo alimentar de dieta HFD foi acompanhado. Esses dados compuseram informações de ganho de massa ao longo do tratamento, consumo alimentar e Índice de Lee:

$$Lee: \frac{\sqrt[3]{\text{peso (g)}}}{CNA (mm)} \times 1000$$

Onde CNA corresponde ao comprimento naso-anal do animal (BERNARDIS & PATTERSON, 1968).

#### 4.11 Morte dos Animais

Os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores (72 horas após realização da última sessão de choque térmico sob jejum de 12 horas), sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos, para posterior realização das análises. O método escolhido para eutanásia baseia-se no fato deste ser um método eficaz que produz mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos, considerando a necessidade de realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação pois os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores (BROWN *et al.*, 2005; SAHA *et al.*, 2005), sendo que, alterações glicêmicas interferem no principal parâmetro medido, a HSP70 (CHUNG *et al.*, 2008).

Os animais foram decapitados em ambiente exclusivamente destinado à morte dos animais, com exaustão e higienização completa de todo o material entre a morte de um animal e outro. A decapitação foi efetuada pelo pesquisador mais experiente, dentre os pesquisadores do grupo, para que o procedimento fosse rápido, com o mínimo de estresse possível para os animais.

Após a morte, os animais foram dissecados para coleta dos tecidos e para o descarte, foram colocados em sacos plásticos identificados com o símbolo de risco biológico e congelados em freezer (-20 °C), destinado para este objetivo, no próprio Laboratório de Fisiologia Celular - FisCel da UFRGS. Seguindo o cronograma semanal da instituição, este material biológico foi encaminhado ao serviço de coleta por empresa licitada pela UFRGS, para então, ter destinação final dos resíduos (autoclavagem e aterro sanitário).

#### 4.12 Medidas Morfométricas

Algumas estruturas internas como pulmões, coração, fígado e tecido adiposo branco epididimal foram avaliados morfometricamente. Fígado e pulmão foram excisados e pesados, calculando-se índices de congestão destes tecidos (hepática e pulmonar). Para isso foi determinada a razão entre o peso fresco do tecido e o peso corporal do animal.

No coração, átrios separados dos ventrículos foram pesados para avaliação de hipertrofia e o tecido adiposo após pesado foi expresso como valor de deposição. Para estas avaliações, a mesma base de cálculo procedeu (razão peso úmido das estruturas (mg) / peso corporal total (g)).

#### 4.13 Dosagens Bioquímicas de Perfil Glicêmico e Lipídico

As análises bioquímicas do perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL e colesterol LDL), perfil glicêmico (glicose de jejum) foram realizadas por testes bioquímicos enzimáticos colorimétricos (LabTest) em leitora de ELISA, segundo protocolo e recomendações do fabricante.

#### 4.14 Dosagens de Nitratos e Nitritos

As avaliações de nitratos/nitritos foram realizadas a partir da concentração de nitratos totais ( $\text{NO}_x^-$ ) no sangue, sendo estimada indiretamente através da produção de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), e determinado com a utilização do reagente de Griess, que é uma mistura de sulfanilamida e naftiletlenodiamina, específica para  $\text{NO}_2^-$ . Em seguida procedeu-se leitura a 540 nm. A concentração de nitritos foi determinada com base na realização de curvas-padrão

(GRISHAM et al, 1996). A quantidade de nitrito, após a dosagem, foi calculada em termos de nM/mL sangue. Foram calculadas ainda nos grupos experimentais, as relações entre as concentrações de nitratos e nitritos  $[\text{NO}_3^-]/[\text{NO}_2^-]$ . Kit colorimétrico Nitrato/Nitrito Cayman Chemical Company Nº 780001.

#### **4.15 Lipoperoxidação TBARS**

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS foram avaliadas para medida indireta de lipoperoxidação. Brevemente, nesta técnica, o plasma dos animais de ambos grupos experimentais foram incubados com hidroxitolueno butilado, ácido tricloroacético 30%, Tris-HCl 10 mM pH 7,4 e ácido tiobarbitúrico 0,73%. Ao final, as amostras foram pipetadas em placas de 96 micropoços para serem lidas a 540 nm em leitora de ELISA. Procedimento para Kit TBARS Cayman Chemical Company Nº 10009055.

#### **4.16 Avaliações Macro e Microscópicas da Aorta**

Os animais anestesiados (conforme já descrito) foram submetidos a realização de perfusão cardíaca. Foi injetado inicialmente solução salina tamponada, PBS (NaCl - 136,8 mM, KCl - 2,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,9 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 6,4 mM, pH 7,4) com auxílio de uma bomba de perfusão, até que a salina liberada da perfusão através do ventrículo direito estivesse livre de sangue (50 ml em média). A seguir injetou-se uma solução de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M (pH7,4) para fixação da aorta (150 ml em média). A aorta foi, então, extraída a partir do bulbo aórtico até as imediações da inserção das artérias subcostais, mantendo a primeira porção de inserção das artérias do tronco

braquiocefálico, subclávia e carótida comum, na região do arco aórtico, sendo a mesma pós-fixada por imersão em paraformaldeído 4%, por 4 h à temperatura ambiente.

Para a análise macroscópica as artérias foram seccionadas no plano longitudinal ao longo da parede posterior e coradas durante 10 minutos em Oil Red O (Sigma). As aortas foram fotografadas em seu tamanho real, e as lesões medidas por área ( $\text{mm}^2$ ) através do programa computacional Image-J versão 1.47 (National Institutes of Health, USA). A proporção de lesões ateroscleróticas macroscópicas foi calculada pela área de lesão em relação à área total.

Para as análises microscópicas da aorta e identificação da espessura arterial e lesão aterosclerótica, os tecidos foram crioprotetidos, primeiro em solução de sacarose 15% seguido de sacarose 30%, diluídas em tampão fosfato 0,1M (pH7,4). O tecido foi então colocado em isopentano e congelado em nitrogênio líquido. As peças anatômicas foram embebidas em componente para criomolde (Tissue-Tek). As secções foram realizadas em micrótomo de congelamento (20  $\mu\text{m}$ ) temperatura de  $-18^\circ\text{C}$  à  $-22^\circ\text{C}$  em planos contínuos de cortes axiais com  $14^\circ$  de angulação na navalha. Após coloração em Oil red O, durante cinco minutos, os cortes foram lavados em água Milli-q seguido da aplicação de DAPI fluorshield (F6057, Sigma), para marcação dos núcleos. As fotomicrografias foram obtidas no microscópio iX81 (Olympus), com filtros específicos e com tempo de aquisição de 5 segundos para salientar a composição do tecido na interação com o corante que possui componentes para fluorescência.

#### **4.17 Expressões Proteicas por Imunodeteção na Aorta**

Para determinação da expressão de GAPDH, VCAM – 1, SIRT – 1, HSF1, HSP70, HSP72 e HSP27 por Western Blot, a artéria extraída, foi limpa em salina 0,9%, e colocada em tubo tipo Eppendorf contendo 350 $\mu\text{l}$  de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% e 1 $\mu\text{l}$  de cada inibidor de protease (fluoreto de fenilmetilsulfonila-PMSF 100 $\mu\text{M}$ , N-tosil-L-lisina clorometil-cetona-TLCK 20 $\mu\text{M}$ , aprotinina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e leupeptina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para serem

homogeneizados em turax. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 15.000 g por 1 min a temperatura ambiente e o sobrenadante coletado. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), e as amostras foram posteriormente diluídas em SDS 0,1% para uma concentração de 2µg/µl, e depois com tampão de amostra [50 mM Tris pH 6,8, SDS 10% (w/v), glicerol 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 10% (v/v) e 2 mg/mL azul de bromofenol], para obter a concentração final de 1µg/µl. Antes de aplicá-las no gel, as amostras foram fervidas a 100°C por 5 min para desnaturação completa das proteínas.

Quantidades iguais de proteína (~40µg por well) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% para separação durante 6 h e utilizando corrente elétrica constante a 5 mA por gel. Foi utilizado o sistema vertical Slab Gel Mini-Protean TetraCell (BIO-RAD) preenchido com tampão de corrida contendo Tris a 25 mM e SDS a 1% (m/v). Foi usado como marcador de peso molecular, 6 µL de mistura de proteínas recombinantes pré-coloridas (cód. RPN800E, GE Health Care) por gel. Para a realização do procedimento de eletrotransferência, pelo qual ocorre a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (GE Health Care), foi utilizado o sistema refrigerado Blot Cell (BIO-RAD) a 100V constantes por 1 h. A confirmação do sucesso dos procedimentos descritos foi obtida pela coloração da membrana de nitrocelulose com Vermelho Ponceau S (Red Ponceau S, sal de sódio 0,3%, Sigma) em solução de ácido tricloroacético a 3% e, em seguida, descoradas com solução TEN (Tris-EDTA-NaCl a respectivamente 50, 5 e 150 mM)-Tween 0,1% (v/v).

O procedimento de imunodeteccção foi realizado inicialmente incubando as membranas de nitrocelulose por 30 min com tampão de bloqueio (albumina a 1% em TEN-Tween 0,1%) em temperatura ambiente; as membranas foram então colocadas, sob agitação, com anticorpo primário específico, a 4°C, overnight. Sendo realizados 3 lavagens consecutivas de 15 min com TEN-Tween 0,1%, e então mais 1 h de incubação se seguiu sob agitação, a 4°C, com o anticorpo secundário. Mais 3 lavagens foram feitas com TEN-Tween 0,1% e a imunodeteccção foi realizada por quimiluminescência com uso de Luminol, ácido p-coumárico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo a quimiluminescência fotodocumentada (60 fotos, 1foto/10seg) e as imagens quantificadas com auxílio do sistema automático ImageQuant 350 (GE Health Care).

Para determinar a expressão de: VCAM – 1 foi utilizado anticorpo monoclonal anti-VCAM - 1 (Santa Cruz cód. SC 8304, produzido em coelho, Anti-VCAM - 1), diluído 1:500 em tampão de bloqueio, seguido de anticorpo conjugado com peroxidase HRP (Sigma cód. A0545, Anti-IgG de coelho), a uma diluição de 1:100.000 em tampão de bloqueio.; SIRT-1

foi utilizado anticorpo monoclonal anti-SIRT-1 (Enzo Life Science cód. BML-SA427-0100, produzido em coelho, Anti-SIRT-1), diluído 1:1.000 em tampão de bloqueio, seguido de anticorpo conjugado com peroxidase HRP (Sigma cód. A0545, Anti-IgG de coelho), a uma diluição de 1:100.000 em tampão de bloqueio.; HSF1 foi utilizado anticorpo monoclonal anti-HSF1 (Enzo Life Science cód. SAB-4501448, produzido em coelho, Anti-HSF1), diluído 1:500 em tampão de bloqueio, seguido de anticorpo conjugado com peroxidase HRP (Sigma cód. A0545, Anti-IgG de coelho), a uma diluição de 1:100.000 em tampão de bloqueio.; HSP70 foi utilizado anticorpo monoclonal anti-HSP70 clone BRM22 (Sigma cód. H5147, produzido em rato, Anti-HSP70), que reconhece tanto a forma induzível de 72-kDa quanto a forma constitutiva de 73-kDa, diluído 1:5.000 em tampão de bloqueio, seguido de anticorpo conjugado com peroxidase HRP (Sigma cód. A9044, Anti-IgG de rato), a uma diluição de 1:100.000 em tampão de bloqueio.; HSP72 foi utilizado anticorpo monoclonal anti-HSP72 clone C92F3A-5 (Santa Cruz cód. SC-66048, produzido em rato, Anti-HSP72), diluído 1:1.000 em tampão de bloqueio, seguido de anticorpo conjugado com peroxidase HRP (Sigma cód. A9044, Anti-IgG de rato), a uma diluição de 1:100.000 em tampão de bloqueio.; HSP27 foi utilizado anticorpo monoclonal anti-HSP27 clone G3.1 (Enzo Life Science cód. ADI-SPA-800f, produzido em rato, Anti-HSP27), diluído 1:1.000 em tampão de bloqueio, seguido de anticorpo conjugado com peroxidase HRP (Sigma cód. A9044, Anti-IgG de rato), a uma diluição de 1:100.000 em tampão de bloqueio.

Como normalizador, foi utilizado GAPDH marcado com peroxidase (Sigma G9295) diluído 1:50.000 com tampão de bloqueio. Os dados serão apresentados como unidades arbitrárias (UA) da razão obtida entre o volume de pixels de cada banda de interesse pela quantidade de pixels detectada nas respectivas bandas das proteínas normalizadoras.

#### **4.18 Ativação da Fração Nuclear de NF- $\kappa$ B**

Para determinação da ativação do NF- $\kappa$ B, utilizou-se o kit NF- $\kappa$ B (p50/p65) Cayman Chemical Company N<sup>o</sup> 10011223, para tanto, foi necessário à obtenção dos extratos nucleares das células da aorta.

A obtenção do extrato nuclear foi realizado utilizando-se amostras de tecido fresco, cortado em pedaços muito pequenos, em tubos para homogeneizador (tipo POTTER). Com as amostras mantidas em gelo, adicionou-se 3 ml Tampão Hypotonic 1X gelado e suplementado com ditioneitol - DTT 3  $\mu$ l [1M] e 3  $\mu$ l de Nonidet P-40 (10%) por grama de tecido utilizado. As amostras homogeneizadas em homogeneizador Polytron (POTTER) foram incubadas em gelo durante 15 minutos. Transferidos para eppendorfs para centrifugação a 300 x g durante 10 minutos a 4°C. O pellet foi resuspendido em 500  $\mu$ L de Tampão Hypotonic 1X (kit) pipetando-se para cima e para baixo várias vezes, incubado em gelo durante 15 minutos. Adicionado 50  $\mu$ l de Nonidet P-40 10%, e novo processo de mistura, pipetando para cima e para baixo. Centrifugou-se as amostras a 14.000 x g durante 30 segundos a 4 °C. O sedimento foi então resuspendido em 50  $\mu$ L Tampão de Extração nuclear (frio) 1X (com inibidores de fosfatase e protease). Ciclos de vortex 30 segundos na configuração mais alta, e 10 minutos de repouso em gelo, novo ciclo de vórtice na potência máxima durante 30 segundos, procedimento repetido num total de seis ciclos. Finalmente centrifugou-se a 14000 x g durante 10 minutos a 4° C. O sobrenadante continha a fração nuclear. E uma pequena alíquota destes extratos foi usada para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A medida de ativação do NF- $\kappa$ B foi realizado conforme as instruções fornecidas pelo protocolo do kit NF- $\kappa$ B/p65 (Cayman) empregando-se as soluções e tampões que acompanhavam o mesmo. As placas de 96 well foram sensibilizadas com o anticorpo de captura e incubado “overnight” (12h), a 4°C. Após esta incubação, as placas foram lavadas e bloqueadas utilizando-se o tampão de lavagem contendo 1% de BSA. Em seguida, foram adicionados 100 $\mu$ L das amostras e do padrão de NF- $\kappa$ B. As amostras foram diluídas 1:10 em tampão de bloqueio a fim de se alcançar a concentração de 15 a 1.000 ng/mL de proteínas no extrato nuclear, como sugerido pelo kit. As placas foram novamente incubadas por 4 horas, em temperatura ambiente. Durante esta incubação, foi proporcionada a ligação específica da forma ativa do NF- $\kappa$ B, contida nos extratos nucleares, aos anticorpos específicos imobilizados nas cavidades da placa. Terminado o período de incubação, as cavidades foram lavadas 4 vezes com 300  $\mu$ L por well de tampão de lavagem. Foram adicionados então 100  $\mu$ L por cavidade do anticorpo de detecção diluído em tampão de bloqueio e as placas foram incubadas por uma hora, em temperatura ambiente. Estes anticorpos, usados para detectar o NF- $\kappa$ B, reconhecem um epítipo nas subunidades p65 que se torna acessível apenas quando este fator nuclear encontra-se ativado e ligado ao seu DNA alvo. Após esta incubação, as

cavidades da placa foram novamente lavadas quatro vezes com tampão de lavagem (300 µL por cavidade) e o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina foi adicionado (100 µL). Ao término de mais uma incubação de 1 hora em temperatura ambiente, foram executadas cinco lavagens, e finalmente foram adicionados às cavidades 100 µL da solução de substrato (pNPP - p-Nitrofenil fosfato) e a placa foi incubada por 30 minutos, em temperatura ambiente, procedendo-se a leitura em leitor tipo ELISA, a 405 nm.

#### 4.19 Determinação Plasmática de HSP72

Para determinação das dosagens de HSP72, Kit *Enzo Life Sciences* (Imunoensaio Enzimático) cod. ADI-EKS-715, o sangue foi coletado em ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) na concentração de 2mg/mL de sangue. O plasma armazenado com inibidores de proteases Leupeptina (Sigma L8511, hemissulfato, FW = 475,59 g/mol), [2 µg/mL = 4,2 µM]; Aprotinina (Sigma A1153, liofilizada; FW = 6511 g/mol) [2 µg/mL = 0,31 µM]; TLCK (cloridrato de N-Tosil-l-Lisina Clorometil Cetona; Sigma T7254; FW = 369,31 g/mol). [1,85 mg/mL = 5 mM]; PMSF (Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila; Sigma P7626; FW= 174,19 g/mol) [1,74 mg/mL = 100 mM].

As concentrações de HSP72 no plasma foram determinadas seguindo as instruções do fabricante. Mensurada por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* – ELISA (450 nm).

# **Resultados**



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Monitoramento do Ganho de Massa Corporal Durante as Semanas do Tratamento de “Choque Térmico”

O ganho de massa corpórea dos animais (Figura 7), em ambos os grupos experimentais conforme descrito metodologicamente, foram acompanhados a partir do 210° até o 270° dia, período este correspondente ao tratamento com choque térmico. O peso médio dos animais no início da fase experimental foi de aproximadamente 24,4g, e ao longo das oito semanas de tratamento apresentaram uma correlação positiva nos dois grupos, no entanto, o ganho de peso corporal foi menor no grupo LDL – heat shock, como pode ser evidenciado pelo grau de angulação da reta que foi de  $\approx 8^\circ$ , enquanto o grupo não tratado (LDL – sick) apresentou um grau de angulação da reta de  $\approx 14^\circ$ . O n experimental inicial foi de 59 e 48 animais para LDL – sick e LDL – heat shock e o n final de 40 e 32 animais respectivamente.

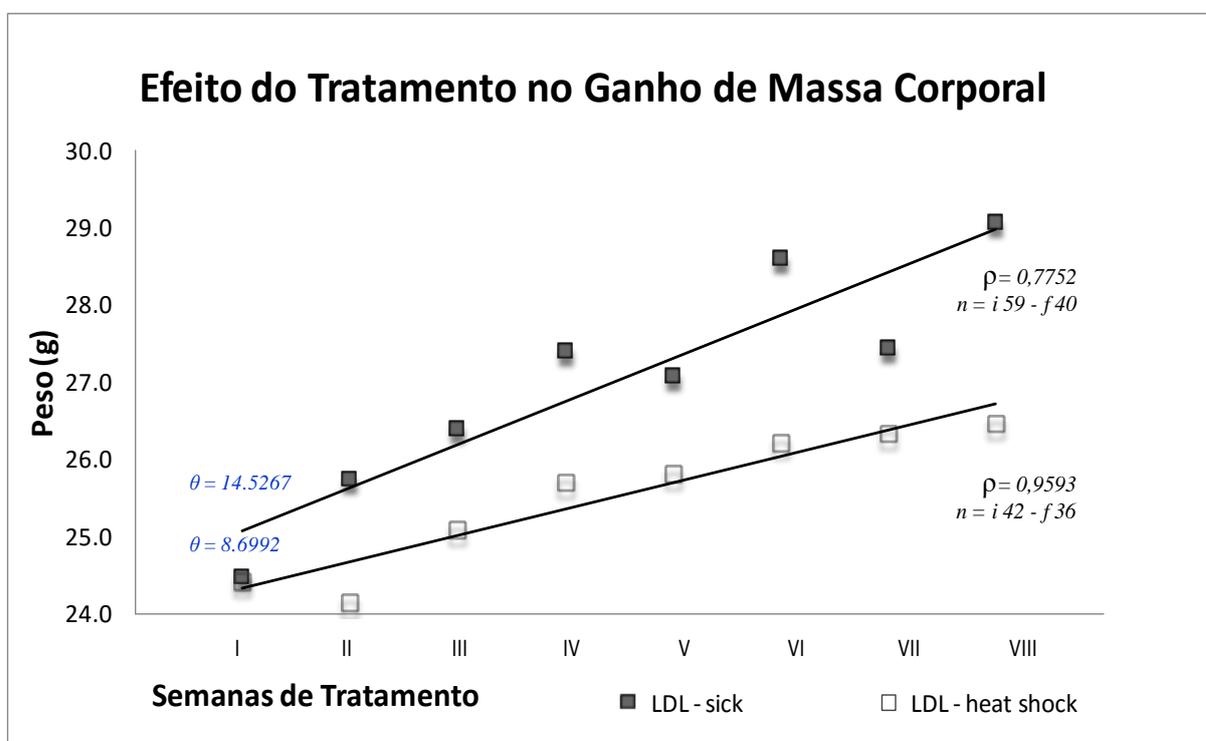


Figura 7. Efeito do tratamento de “choque térmico” no ganho de massa corporal. A evolução do peso corporal (média) ao longo de oito semanas de tratamento, os animais tratados (LDL – heat shock) tiveram um aumento de massa menor que o grupo controle-doente (LDL - sick), o que é evidenciado pelo grau de angulação da reta de correlação. LDL – sick n experimental inicial-(i) 59, final-(f) 40; LDL – heat shock n (i) 42, (f) 36.

Quando comparado o desempenho semanal entre os dois grupos experimentais, é possível observar que o tratamento crônico com choque térmico reduziu com eficiência o ganho de massa do grupo LDL – heat shock, a partir da terceira semana de tratamento (Figura 8). As grandes flutuações de massa (desvio padrão) apresentadas pelos grupos experimentais, em especial LDL-sick, é dado por eventos não ligados às rotinas semanais de choque térmico, mas sim como consequência do agravamento do quadro aterosclerótico.

Estes eventos isolados observados na segunda, quinta e sétima semanas de tratamento referem-se à morte de um maior número de animais do grupo LDL – sick que mascaram os dados reais, haja vista, que obrigatoriamente estes animais apresentavam uma grande perda de peso corporal, como um evento pré-morte. Esta perda de peso correspondente a aproximadamente 26% da massa corporal total, deixavam os animais em estado de caquexia grave, e levava a morte de forma rápida em menos de uma semana. Estes mesmos eventos deixaram de ocorrer no grupo LDL – heat shock após a segunda semana de tratamento.

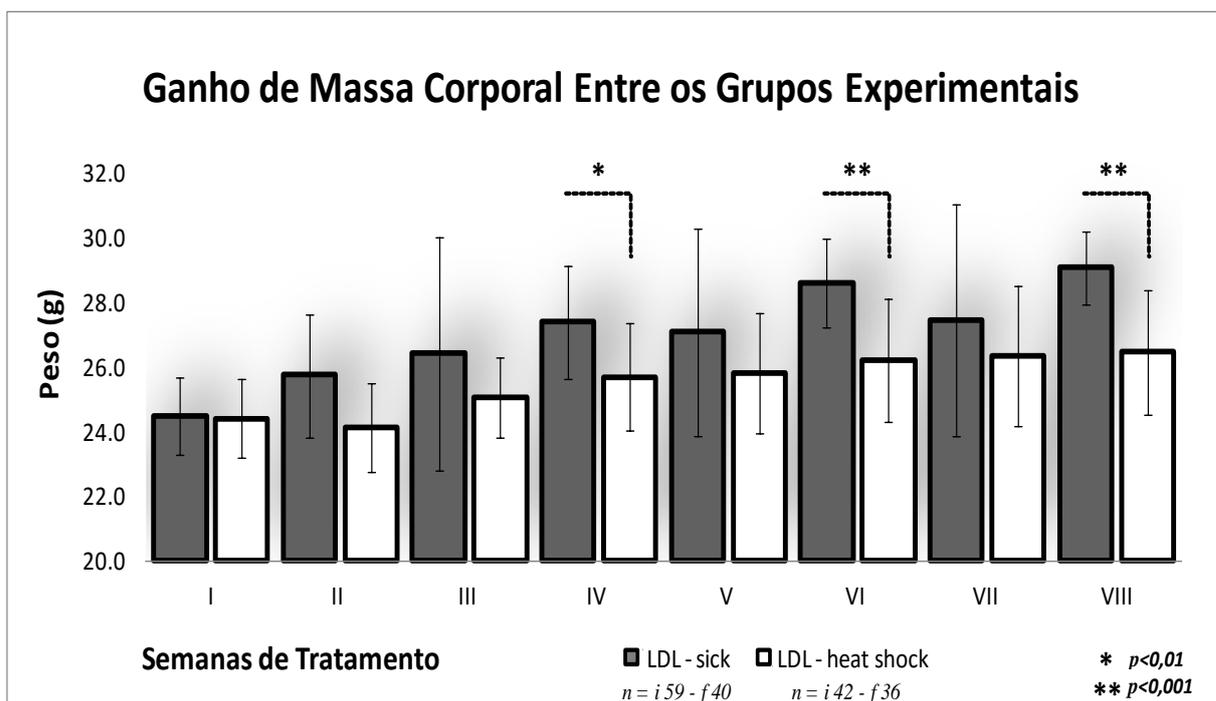


Figura 8. **Comparação do ganho de massa corporal nos grupos experimentais por semana de tratamento.** A avaliação do desempenho semanal no ganho de peso corporal apontou efeitos significativos na quarta ( $p < 0,01$ ), sexta e oitava ( $p < 0,001$ ) semanas de tratamento entre os grupos, Teste t-Student. Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL - sick) e choque térmico (LDL – heat shock). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, LDL – sick n experimental inicial-(i) 59, final-(f) 40; LDL – heat shock n (i) 42, (f) 36.

Os índices de Lee dos grupos estudados, refletiram os dados precedentes, ao diferirem estatisticamente ( $p < 0,01$ ; Teste t-Student) no desfecho do tratamento de choque térmico no grupo LDL – heat shock ao longo das oito semanas. O índice médio foi de  $33,4 \pm 1,6$  para LDL – sick; e  $31,2 \pm 0,9$  para LDL – heat shock, dados apresentados pela expressão da média e desvio padrão (Figura 9). As medidas foram aferidas em um total de 12 animais por grupo.

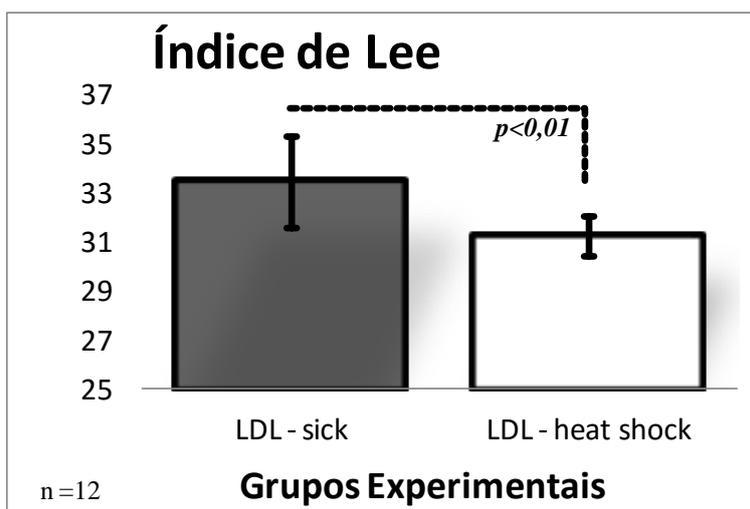


Figura 9. Índice de Lee. O tratamento crônico de choque térmico por oito semanas reduziu significativamente ( $p < 0,01$ ) o índice de Lee no grupo tratado com choque térmico. Teste t-Student. Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL - sick) e choque térmico (LDL - heat shock). Dados apresentados com média  $\pm$  desvio padrão ( $n=12$ ).

## 5.2 Ingestão Calórica de “High Fat Diet - HFD” Durante o Tratamento

Segundo os resultados apresentados anteriormente (item 5.1), cogitamos se as diferenças de massa corporal entre os animais dos grupos experimentais em questão, não seriam causadas por um menor consumo alimentar. Seria o choque térmico capaz de alterar o comportamento alimentar dos animais em tratamento crônico?; Para que estas e outras questões referentes ao tratamento fossem de imediato excluído, acompanhamos o consumo alimentar dos animais dos 90 - 270º dias de vida, e os dados mostraram que o consumo médio de 2 g/dia por animal (aproximadamente 10,5 k/cal), manteve-se invariável por todo o período

experimental quando comparado entre os grupos e aos demais animais do mesmo procedimento experimental (Figura 10).

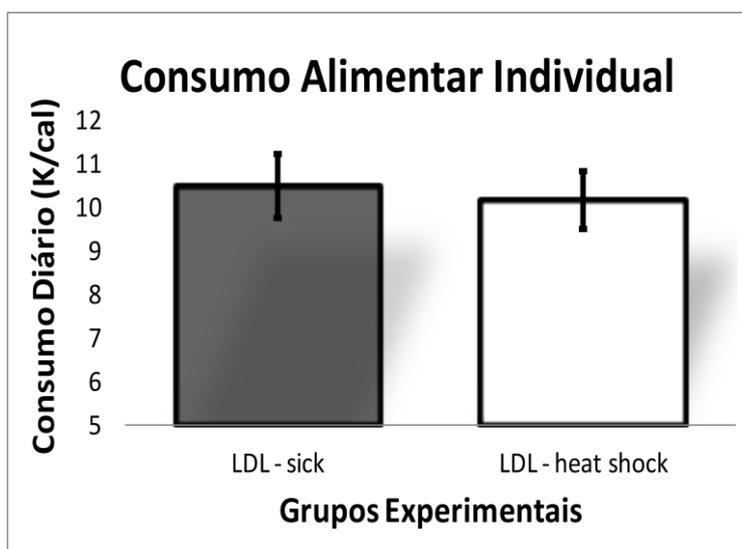


Figura 10. **Consumo calórico diário.** A ingestão alimentar individual (k/cal) não difere entre os grupos em função do tratamento. Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL - sick) e choque térmico (LDL - heat shock). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n=15.

### 5.3 Estimativa de Sobrevivência de Kaplan-Meier, Efeitos do Tratamento Crônico

A curva de sobrevivência de Kaplan-Meier é usada como probabilidade de sobreviver em um determinado período de tempo e foi aplicada como método de comparação da eficácia do tratamento (choque térmico) na recuperação, ao menos em parte, dos danos causados pelo longo consumo de uma dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica entre os grupos estudados, gerando longevidade.

O número total de mortes apresentadas pelo grupo doente (LDL - sick), n inicial 59, foram de 19 animais ocorridas entre os 171° - 264° dias, enquanto os animais tratados (LDL - heat shock), n inicial 42, foram de seis mortes entre os 180° - 218° dias. Estas diferenças representam uma perda de 32,8% dos animais não tratados, uma probabilidade de sobrevivência

numa escala de 0-1 de  $0,65 \pm 0,064$ , durante toda a fase de estudos, quando comparados às taxas de sobrevivência de  $0,83 \pm 0,061$  do grupo LDL – heat shock, apresentando apenas 11,9% de mortes. Ressalta-se que as mortes de LDL – heat shock ocorreram até o início da segunda semana do período de tratamento de choque térmico, evidenciando a eficácia do tratamento no aumento da sobrevivência dos animais ateroscleróticos. Estatisticamente foram elaborados ensaios de hipótese de Mantel-Cox ( $p < 0,05$ ) a partir do teste de Log-Rank (Figura 11).

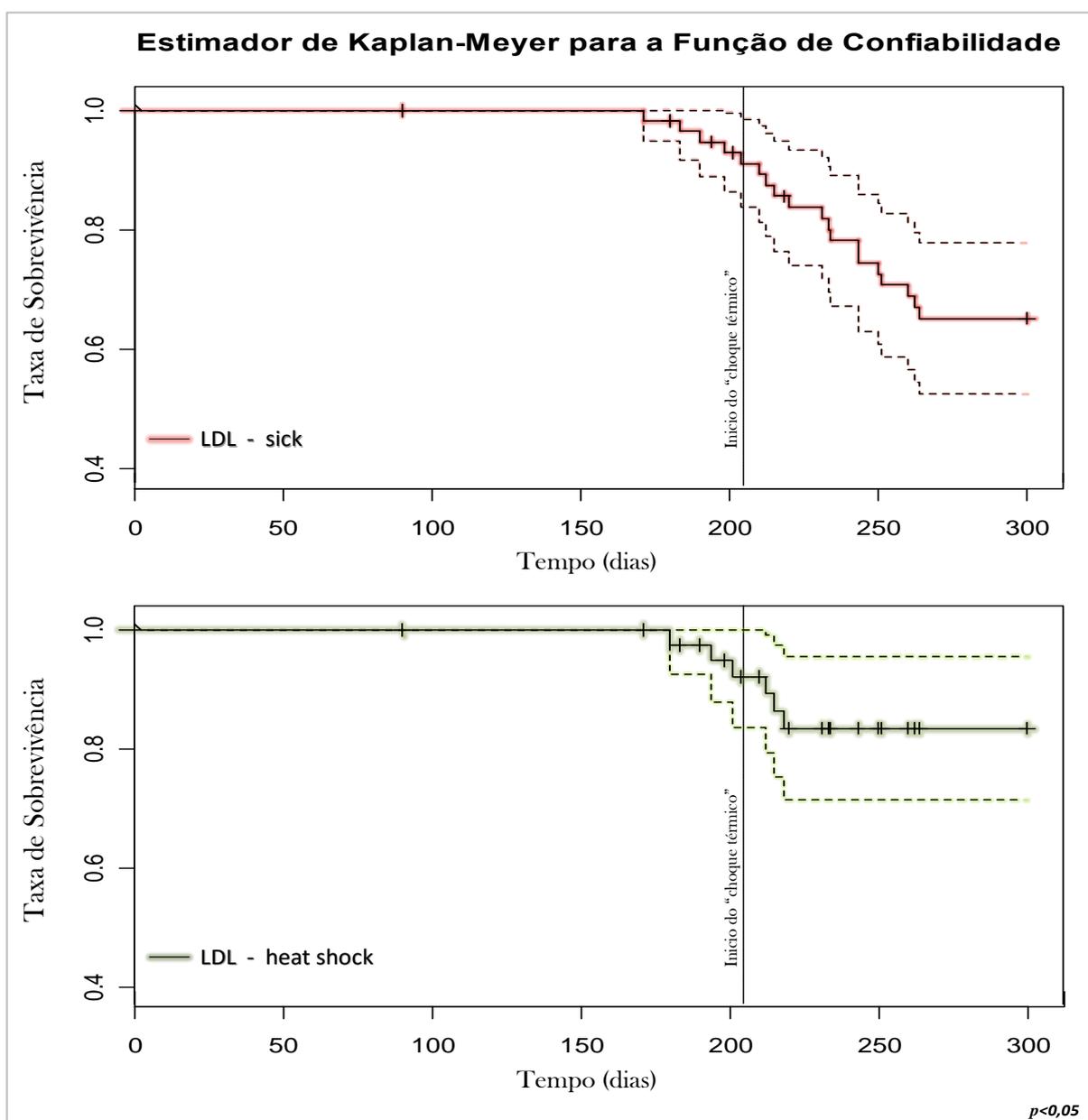


Figura 11. **Análise de sobrevivência, hipótese probabilística de Kaplan-Meier.** A avaliação da sobrevivência esperada é apresentada nos gráficos em seus limites (superiores e inferiores) de confiabilidade para os grupos LDL – sick e LDL – heat shock respectivamente. O tratamento com choque térmico por um período de oito semanas reduziu, significativamente ( $p < 0,05$ ), o número de mortes aumentando a sobrevivência dos animais enfermos. Fiabilidade estatística de Mantel-Cox, teste de hipótese de Log-Rank. LDL – sick n experimental inicial-(i) 59, final-(f) 40; LDL – heat shock n (i) 42, (f) 36.

Os efeitos do tratamento crônico de choque térmico foram também perceptíveis na aparência epidérmica macroscópica dos animais (Figura 12). O consumo de uma dieta HFD hipercolesterolêmica por períodos prolongados como no esquema experimental, levou a um grave comprometimento dos vasos sanguíneos periféricos. Regiões corporais extremas como orelhas, caudas, pés e até mesmo locais onde o fluxo sanguíneo ocorre em pequenos vasos, fossem gravemente prejudicados levando, na maior parte dos casos, a perda da micro circulação, ocorrendo grandes áreas de necrose e perda efetiva de importantes estruturas, como a cauda.

O choque térmico melhorou estas lesões no grupo LDL – heat shock, a partir da terceira semana, impedindo que estes animais ao chegarem ao término do tratamento apresentassem tamanho dano estrutural epidérmico ou amputações naturais como as observadas no seu grupo controle doente, LDL – sick.



Figura 12. **Aparência epidérmica macroscópica como reflexo do tratamento de choque térmico.** A melhora da condição física das estruturas injuriadas pelo comprometimento da micro circulação, são evidenciados nos animais do grupo LDL – heat shock, a partir da terceira semana de tratamento, como apresentado no 240º dia. O tratamento com choque térmico impediu a evolução dos danos causados pelos problemas circulatórios que levaram a perda de estruturas como caudas e orelhas e o comprometimento epidérmico observado no grupo LDL – sick.

#### 5.4 Resposta a Sobrecarga Glicídica e Insulínica nos Testes de Tolerância

Após 72 horas da última sessão de choque térmico, na oitava semana, os animais foram submetidos à avaliação da resposta glicêmica a sobrecarga de glicose. No procedimento foram injetados intraperitonealmente glicose [1 g/Kg em 0,9% NaCl] nos animais, em jejum prévio de 12 horas.

O tratamento modificou significativamente ( $p < 0.01$ ) a concentração de glicose circulante entre os grupos, no tempo zero ( $t=0$ ) (Figura 13), os animais que receberam cronicamente choque térmico ao longo das oito semanas, LDL – heat shock, apresentaram uma redução na glicemia de jejum, aproximadamente 1,6 mM/L, e ao longo do teste de tolerância ( $t=30$ ,  $t=60$ ,  $t=90$  e  $t=120$ ), mantiveram esta diferença, respondendo a sobrecarga, recuperando totalmente a glicemia basal duas horas após o início do teste ( $t=120$ ).

A variação glicêmica entre os tempos 30 e 90 minutos da curva glicêmica, no grupo controle doente (LDL - sick), parece anunciar uma condição de menor tolerância à glicose, visto que a capacidade da recuperação da glicemia apareceu alterada.

Após a obtenção dos dados relativos aos testes de tolerância à glicose, procedemos com o cálculo da área sob a curva, como um coadjuvante nesta análise, a área sob a curva foi calculada pela lei de formação da integral de uma função no plano cartesiano. Os valores obtidos (Figura 13 ‘em detalhe’) confirmam que a resposta à sobrecarga de glicose é diferente nos animais submetidos ao choque térmico em comparação ao grupo controle ( $p < 0.001$ ). A área sob a curva dos animais submetidos ao choque térmico (LDL – heat shock) é menor, indicando uma melhor tolerância, quando comparado ao seu grupo controle doente (LDL - sick).

Os efeitos do choque térmico também foram refletidos na resposta a sobrecarga hormonal intraperitoneal de insulina regular [0,75 UI/Kg]. A resistência insulínica apresentada pelo grupo controle aterosclerótico desapareceu no grupo tratado com choque térmico (Figura 14).

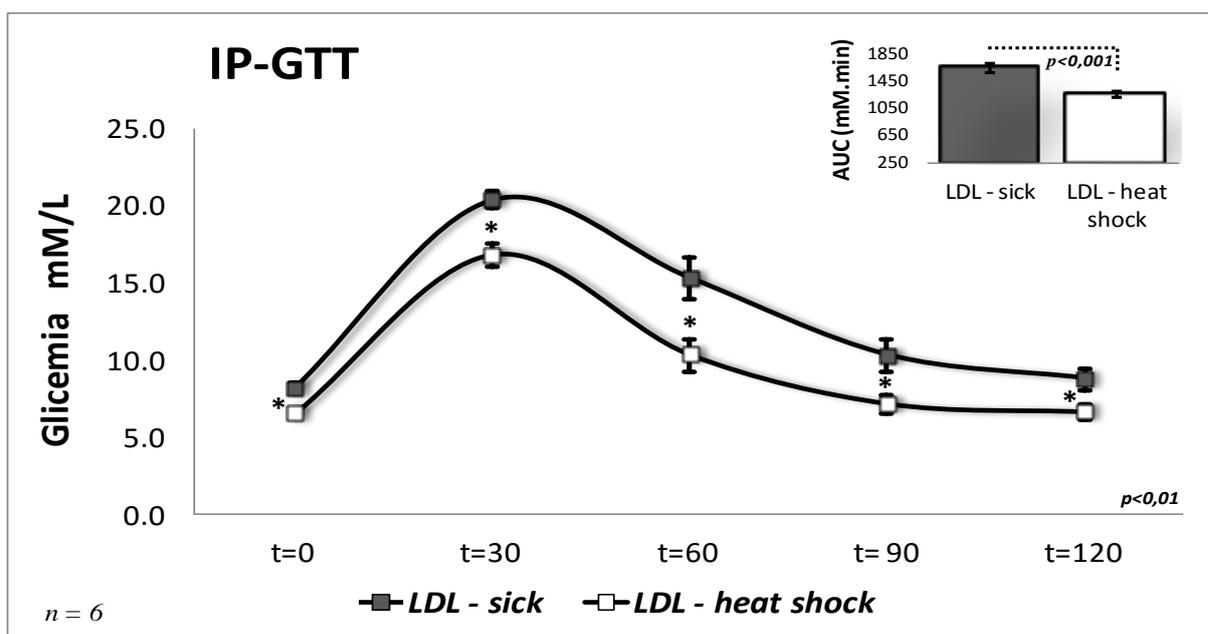


Figura 13. Testes de tolerância à glicose e análise da área sob a curva. A sobrecarga à glicose i.p. [1 g/kg em 0,9% NaCl] realizada em jejum (12 horas), 72 horas após a última sessão de choque térmico (oitava semana) apresentou boa tolerância no grupo tratado ( $p < 0,01$ ). Glicemia mensurada com glicosímetro (*Optium Xceed da Abbott*) por punção caudal distal. Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL - sick) e choque térmico (LDL - heat shock). Em detalhe análise da área sob a curva, demonstrando melhor tolerância à glicose ( $p < 0,001$ ). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ . Teste t-Student para comparação entre os grupos em cada tempo experimental.

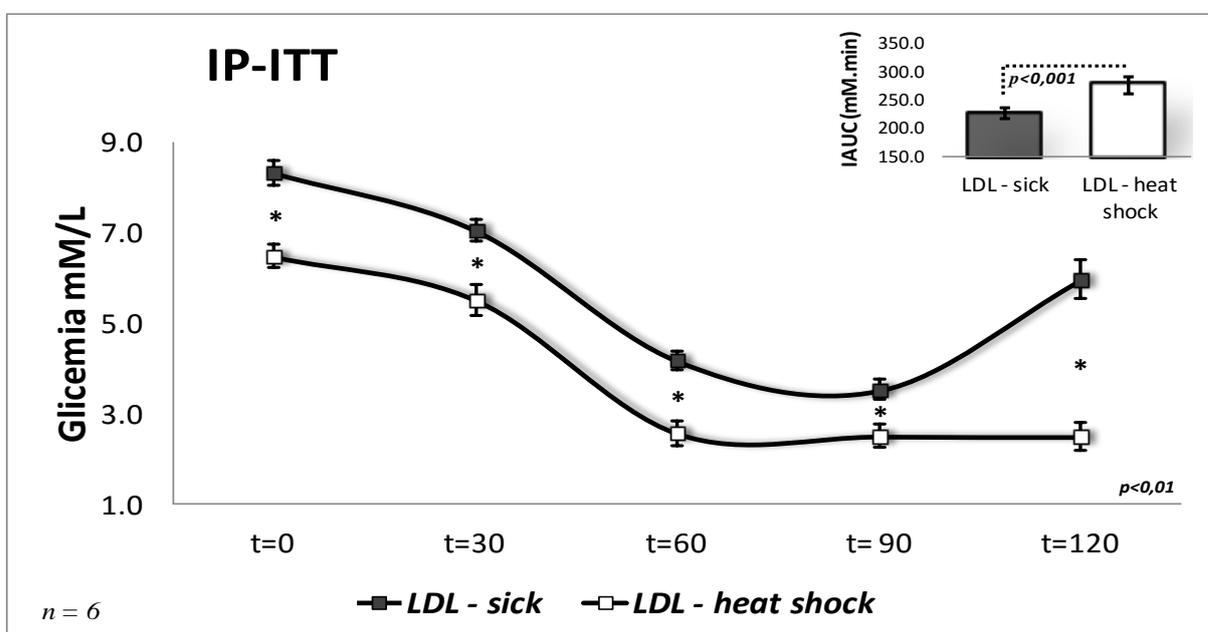


Figura 14. Testes de tolerância à insulina e análise da área incremental sob a curva. A sobrecarga à insulina i.p. [0,75 U/kg] realizada em jejum (12 horas), 72 horas após a última sessão de choque térmico (oitava semana) apresentou melhor sensibilidade no grupo tratado ( $p < 0,01$ ). Glicemia mensurada com glicosímetro (*Optium Xceed da Abbott*) por punção caudal distal. Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL - sick) e choque térmico (LDL - heat shock). Em detalhe análise da área incremental sob a curva, demonstrando melhor resposta à sobrecarga hormonal ( $p < 0,001$ ). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ . Teste t-Student para comparação entre os grupos em cada tempo experimental.

A alta sensibilidade ao hormônio, apresentado pelo grupo LDL – heat shock, pode ser observada pela área incremental sobre a curva (Figura 14 ‘em detalhe’), calculada geometricamente por meio da aplicação da regra trapezoidal, excluindo-se as áreas abaixo da linha de jejum (tempo zero). O tratamento “estabilizou” a glicemia [2,5 mM/L], prolongando o efeito hormonal da insulina (t=60 ao t=120) nos animais tratados (LDL – heat shock).

### 5.5 Aspectos Bioquímicos do Tratamento Crônico de Choque Térmico

O tratamento prolongado de choque térmico demonstrou alterar a glicemia de jejum nos testes de sobrecarga (item 5.4), por esta razão seria pertinente pensarmos que tais alterações poderiam ter sido também refletidas em outros parâmetros como nos lipídios circulantes. Estas análises foram realizadas em plasma em testes colorimétricos, 72 horas após a última sessão de choque térmico e período de jejum de 12 horas.

A glicemia de jejum (Tabela 1), novamente avaliada, apresentou uma redução de aproximadamente 30% no grupo LDL – heat shock quando comparado ao grupo doente, repetindo os dados apresentados anteriormente. Os níveis lipídicos de triglicérides e colesterol total também apareceram reduzidos no grupo tratado cronicamente com choque térmico, a queda apresentada foi de 35% e 42% respectivamente.

As lipoproteínas de densidade alta tiveram um aumento de seus níveis circulantes, em função do tratamento, de 0,58 mM/L (LDL - sick) para 1,02 mM/L (LDL – heat shock), o que representa um adito de mais de 75% da concentração desta lipoproteína. Os níveis de lipoproteínas de densidade muito baixa e de densidade baixa (LDL) reduziram seus níveis circulantes em 35% e 47,5% respectivamente (Tabela 1). As alterações significativas ( $p < 0.001$ ) nos parâmetros lipídicos causados pelo tratamento, principalmente dos níveis de HDL e de LDL, devem refletir diretamente no grau e gravidade da formação aterosclerótica.

Tabela 1. **Parâmetros bioquímicos, glicose e lipídios circulantes.** Análises realizadas em jejum (12 horas), 72 horas após a última sessão de choque térmico (oitava semana), redução dos níveis de glicose, triglicérides, colesterol total, lipoproteínas de densidade muito baixa – VLDL e baixa – LDL; e aumento dos níveis de lipoproteínas de densidade alta – HDL, em função do tratamento ( $p < 0,001$ ). Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL - sick) e choque térmico (LDL - heat shock). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 13$ . Teste t-Student para comparação entre os grupos.

<b>PERFIL GLICÍDICO E LIPÍDICO (mM/L)</b>		
	<b>LDL - sick</b>	<b>LDL - heat shock</b>
<b>Glicose</b>	8,35 $\pm$ 0,1	5,91 $\pm$ 0,14 *
<b>Triglicerídeos</b>	16,92 $\pm$ 1,71	10,93 $\pm$ 1,44 *
<b>Colesterol Total</b>	20,59 $\pm$ 2,11	11,86 $\pm$ 0,45 *
<b>Colesterol HDL</b>	0,58 $\pm$ 0,09	1,02 $\pm$ 0,04 *
<b>Colesterol VLDL</b>	3,38 $\pm$ 0,34	2,19 $\pm$ 0,28 *
<b>Colesterol LDL</b>	16,58 $\pm$ 1,82	8,70 $\pm$ 0,27 *

Médias  $\pm$  desvio padrão, \* Teste T  $p < 0,001$  (LDL - sick Vs. LDL - heat shock)

## 5.6 Aspectos Morfométricos e Anatômicos de Órgãos e Tecidos Internos

Algumas estruturas internas como pulmão, coração, fígado e tecido adiposo epididimal foram avaliados morfometricamente. Fígado e pulmão após excisados e pesados calculou-se o índice de congestão (hepática e pulmonar). No coração, átrios separados dos ventrículos foram pesados para avaliação de hipertrofia e o tecido adiposo após pesado foi expresso como valor de deposição. Para estas avaliações, determinou-se a razão peso úmido das estruturas (mg) / peso corporal total (g).

Nas avaliações pulmonares, não houve diferença estatística ( $p = 0,740$ ;  $n = 25$ ) decorrentes do tratamento na comparação entre os dois grupos, tornando-os equivalentes no aspecto da congestão pulmonar (Figura 15). Outras alterações de dano tecidual não foram observadas nos pulmões.

Entretanto, as alterações hepáticas foram visíveis (Figura 17) e pode-se notar uma redução do acúmulo lipídico, no fígado dos animais tratados (LDL – heat shock), destacado através da coloração do órgão, que manteve seu aspecto sadio contrastando com a aparência amarelada do fígado do animal doente (LDL – sick). O fígado dos animais LDL – sick

apresentaram ainda, um aumento de tamanho e de massa, cerca de 15% ( $p < 0,001$ ;  $n = 25$ ), caracterizando uma hipertrofia, causada pela congestão sanguínea e excesso de lípidos (Figura 16).

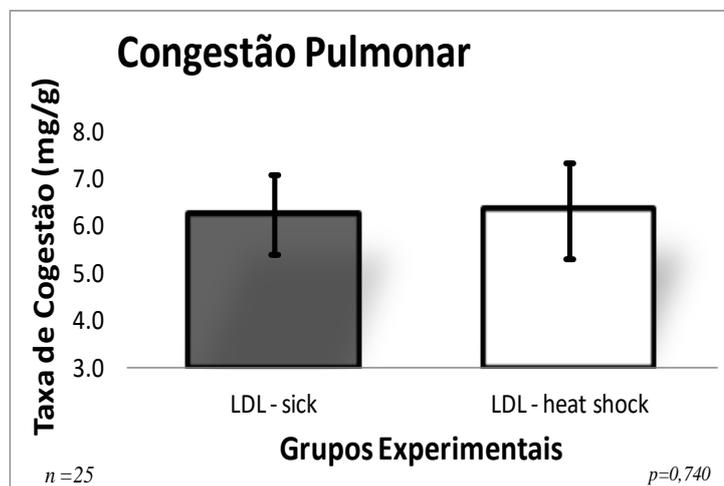


Figura 15. **Congestão pulmonar, avaliação de hipertrofia do pulmão.** Razão peso úmido dos pulmões (mg) / peso corporal total (g), não ocorreram alterações em função do tratamento. Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL - sick) e choque térmico (LDL - heat shock). Teste t-Student ( $p < 0,740$ ). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 25$ .

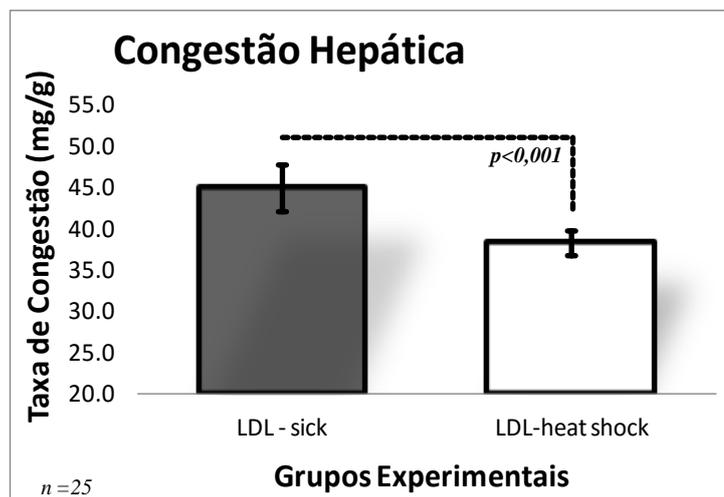


Figura 16. **Congestão hepática, avaliação de hipertrofia do fígado.** Razão peso úmido do fígado (mg) / peso corporal total (g), o tratamento reduziu a taxa de congestão ( $p < 0,001$ ) no grupo LDL - heat shock, evitando a hipertrofia do órgão. Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL - sick) e choque térmico (LDL - heat shock). Teste t-Student. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 25$ .

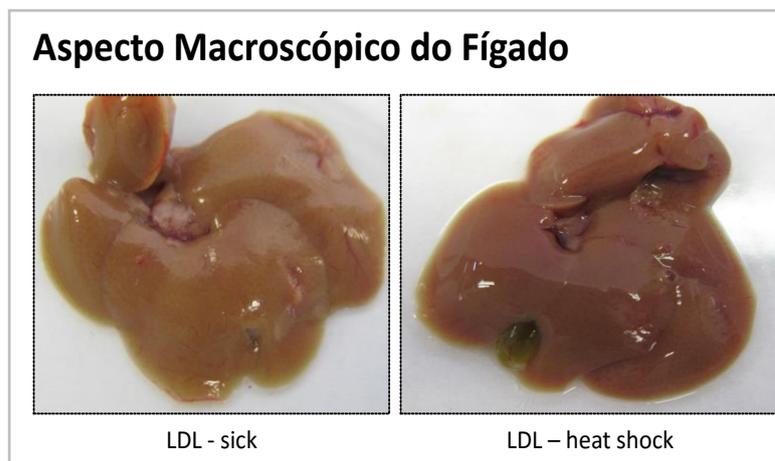


Figura 17. **Alterações hepáticas do tratamento de choque térmico.** Imagens representativas do tratamento, efeitos sobre o fígado. Grupo experimental controle aterosclerótico (LDL - sick) apresentando coloração alterada pela presença de gordura (esteatose). Fígado de animais choque térmico (LDL - heat shock) com aspectos normais de coloração e tamanho.

Quanto ao aumento da massa (hipertrofia) dos ventrículos, embora considerada compensatória, é um preditor independente de maior morbimortalidade cardiovascular, e é um importante fator de risco para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca tanto sistólica quanto diastólica. No tratamento com choque térmico, o grupo LDL - heat shock reduziu a taxa de hipertrofia ( $p < 0,001$ ) em aproximadamente 9,7%, reduzindo a resistência aórtica, diminuindo o esforço miocárdico ventricular e a congestão sanguínea (Figura 18). Efeitos que foram confirmado em doppler (item 5.14).

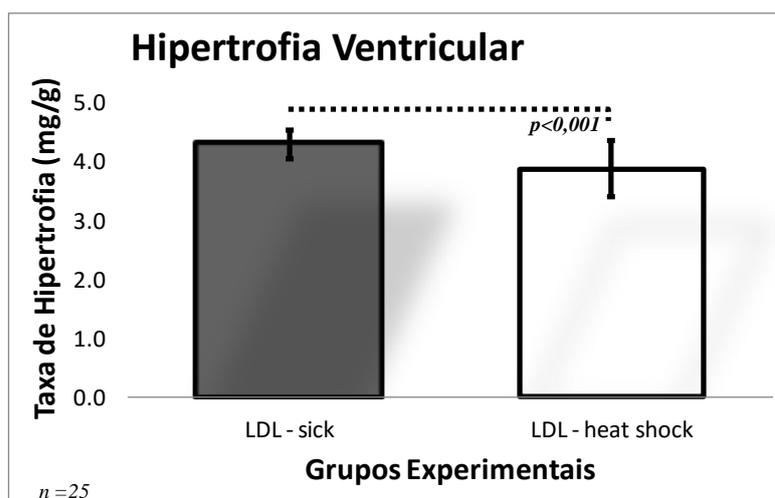


Figura 18. **Hipertrofia miocárdica ventricular.** Razão peso úmido ventricular (mg) / peso corporal total (g), o tratamento reduziu a taxa de hipertrofia ( $p < 0,001$ ) no grupo LDL - heat shock, evitando a congestão do órgão. Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL - sick) e choque térmico (LDL - heat shock). Teste t-Student. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 25$ .

Os depósitos de tecido adiposo branco epididimal sofreram drásticas reduções ( $p < 0,001$ ) em virtude do tratamento, a taxa de deposição foi de 22,8 mg/g de peso corporal nos animais doentes (LDL – sick) e 9,7 mg/g para os animais LDL – heat shock (Figura 19), uma queda representativa de 57,3% no tamanho do depósito. Foram observados ainda reduções de massa adiposa branca retroperitoneal e visceral nos animais tratados com choque térmico.

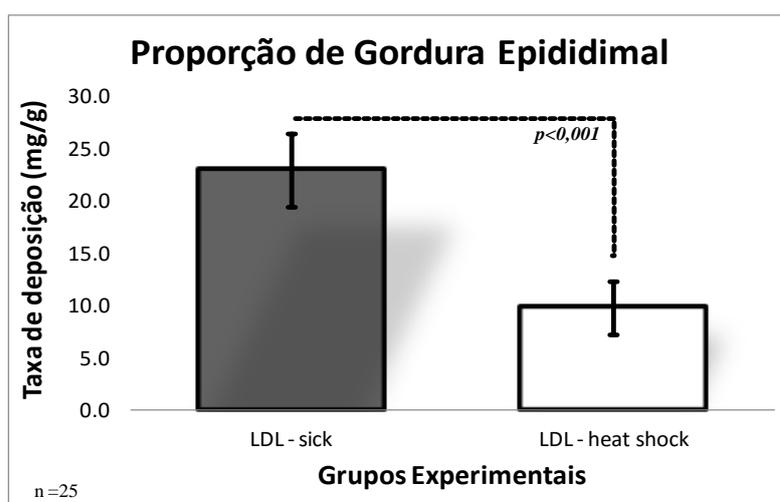


Figura 19. **Taxa de deposição de gordura epididimal.** Razão massa tecido adiposo (mg) / peso corporal total (g), o tratamento reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ) os depósitos de tecido adiposo no grupo LDL – heat shock. Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL – sick) e choque térmico (LDL – heat shock). Teste t-Student. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n= 25.

### 5.7 Nitratos e Nitritos Como Medida Indireta de Óxido Nítrico

O NO importante fator vasodilatador dos vasos, por tanto um nitrovasodilatador, é formado através da transformação do aminoácido L-arginina em L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintetase, sua inativação ocorre através da combinação com o heme da hemoglobina inativado na presença de oxigênio, sendo convertido a nitrato, ou pela oxidação direta a nitrato e nitrito que é excretado na urina. Participam desta reação de síntese as

izoenzimas da sintase do NO (I, II e III), sendo a izoenzima II conhecida por ser estimulada em situações de inflamação (como na aterosclerose).

As diferenças na concentração de nitrato e nitrito totais ( $\text{NO}_x^-$ ) no plasma, nos dois grupos, foi estatisticamente significativa (Tabela 2). A redução na concentração plasmática foi de 42%, nos animais que receberam tratamento LDL – heat shock.

Os níveis de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) foram maiores nos animais “choque térmico” (+ 55,2%), enquanto os níveis de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) apresentaram uma menor taxa neste grupo (- 57,9%). Assim, podemos presumir que o choque térmico reduziu os níveis de  $\text{NO}_x^-$  pela menor produção de NO, haja vista que a condição do vaso também melhorou (item 5.10).

Foram calculadas ainda nos grupos experimentais, as relações entre as concentrações de nitratos e nitritos  $[\text{NO}_3^-]/[\text{NO}_2^-]$ . Essas relações mostram que as proporções de  $\text{NO}_2^-$  plasmático em relação ao  $\text{NO}_3^-$  é maior no grupo LDL – sick (1:11) quando comparado ao grupo tratado, LDL – heat shock (1:2). Esses dados demonstram haver, uma tendência à normalização do desvio da reação  $\text{NO}_3^-$  (nitrato)  $\leftrightarrow$   $\text{NO}_2^-$  (nitrito) para a direita, com maior formação de  $\text{NO}_2^-$  em virtude do tratamento nos animais LDL – heat shock.

Tabela 2. **Concentração dos níveis de nitratos e nitritos plasmático.** Análises realizadas em jejum (12 horas), 72 horas após a última sessão de choque térmico (oitava semana), redução dos níveis de nitratos e nitritos totais ( $\text{NO}_x^-$ ) e nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ); e aumento dos níveis de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) em função do tratamento ( $p < 0,001$ ). Razão  $[\text{NO}_3^-]/[\text{NO}_2^-]$ , reduzida nos animais do grupos experimental choque térmico, LDL – heat shock (1:2), comparado ao controle aterosclerótico, LDL – sick (1:11). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n= 8. Teste t-Student para comparação entre os grupos.

<b>NITRATOS (<math>\text{NO}_3^-</math>) E NITRITOS (<math>\text{NO}_2^-</math>) [nmol/mL]</b>		
	<b>LDL - sick</b>	<b>LDL - heat shock</b>
$\text{NO}_x^-$	198,64 $\pm$ 38,9	113,3 $\pm$ 26,4 *
$\text{NO}_2^-$	16,43 $\pm$ 4,5	36,71 $\pm$ 5,1 *
$\text{NO}_3^-$	182,2 $\pm$ 34,8	76,63 $\pm$ 21,4 *
$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	11,32 $\pm$ 1,2	2,05 $\pm$ 0,3 *

Médias  $\pm$  desvio padrão, \* Teste T  $p < 0,001$  (LDL - sick Vs. LDL - heat shock)

## 5.8 TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, Medida de Lipoperoxidação

A grande concentração de NO gerado pelo quadro aterosclerótico pode reagir rapidamente com oxigênio e formar anidrido nitroso ( $N_2O_3$ ) e outros compostos N-nitroso visto que o NO é uma Espécie Reativa de Nitrogênio – ERN, um dos radicais livres (RLs) responsáveis pelo estresse oxidativo causador de uma série de danos celulares. Esses RLs reagem com PUFAs e AGLs, servindo como iniciadores dos processos de lipoperoxidação (LPO).

As taxas de LPO foram apuradas pelo ensaio com substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS, onde os valores médios apresentados pelos grupos experimentais foram de 38,86 nmol/mL para LDL – sick e 23,07 nmol/mL para LDL – heat shock (Figura 20). As reduções na LPO (-40,6%) foram significativas ( $p < 0,001$ ;  $n = 6$ ) e representam um efeito benéfico do choque térmico por impedir o dano lipídico de moléculas insaturadas das membranas celulares.

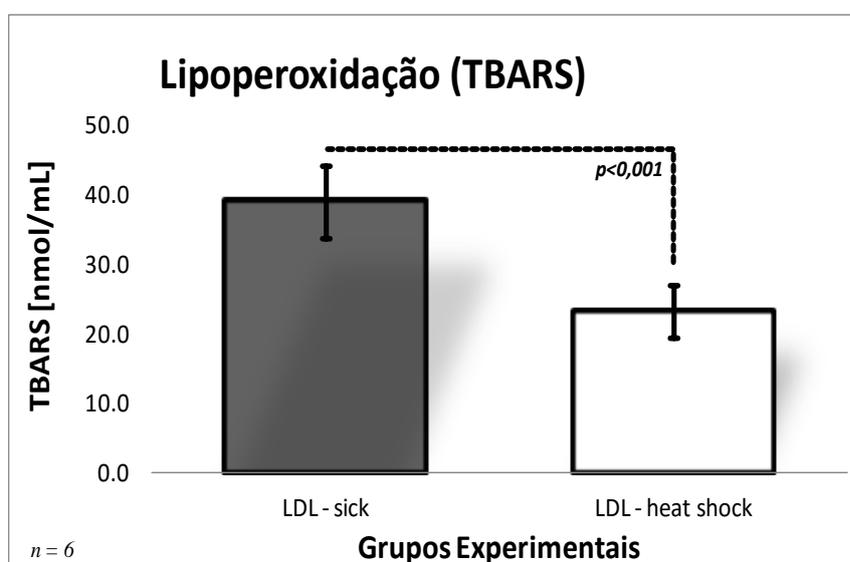


Figura 20. Taxa de lipoperoxidação. Avaliação pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS, redução significativa ( $p < 0,001$ ) dos níveis de dano às estruturas lipídicas no grupo tratado, LDL – heat shock. Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL – sick) e choque térmico (LDL - heat shock). Teste t-Student. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ .

### 5.9 Caracterizações Macroscópicas da Deposição Lipídica na Aorta

As análises do efeito do tratamento de choque térmico sobre as artérias (aorta) foram realizadas em um primeiro momento macroscopicamente, através da deposição de lípidos sobre a superfície endotelial. A aorta foi retirada a partir do bulbo aórtico até as imediações da inserção das artérias subcostais, mantendo a primeira porção de inserção das artérias do tronco braquiocefálico, subclávia e carótida comum, na região do arco aórtico. Abertas longitudinalmente pela parte ventral foram coradas com Oil red O.

As áreas de deposição lipídica aórtica foram medidas pelo programa Image-J ( $\text{mm}^2$ ), e expressas em valores percentuais sobre a área total do tecido. O tratamento reduziu ( $p < 0,01$ ;  $n=8$ ) a deposição lipídica no grupo LDL – heat shock em  $\approx 54,6\%$  (Figura 21), os valores médios apresentados por grupo foram de  $57,91 \pm 12,3\%$  para LDL – sick, e  $26,27 \pm 3,1\%$  para LDL – heat shock.

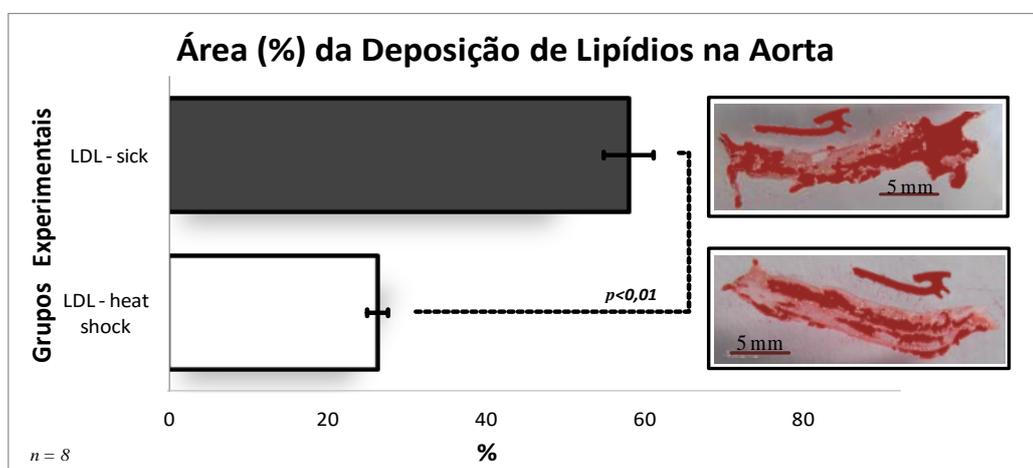


Figura 21. Efeito do “choque térmico” na deposição lipídica da aorta, aspecto macroscópico. Área total coberta por lípidos depositados no endotélio (%), redução significativa ( $p < 0,01$ ) de lípidios no grupo tratado, LDL – heat shock (-54,6%). Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL – sick) e choque térmico (LDL - heat shock). Coloração em Oil red O, avaliação de área pelo software Image-J. Teste t-Student. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n= 8$ .

### 5.10 Caracterizações Microscópicas da Deposição Lipídica na Aorta, Coloração de Oil red O – Ensaio de Fluorescência

O tratamento apresentou melhorias que foram visíveis macroscopicamente através da redução da deposição de lípidos nas artérias. Mas uma questão ainda precisava ser respondida, o tratamento com choque térmico seria capaz de alterar a formação da placa de aterosclerose?; Assim, buscamos avaliar as estruturas envolvidas microscopicamente a fim de estimar o efeito do tratamento sobre a formação da placa.

Para as análises microscópicas da aorta foram realizados cortes axiais do tecido perfundido (fixado em paraformaldeído 4%) e incluso em componente para criomolde (Tissue-Tek). As secções foram realizadas em micrótomo de congelação (20 µm) temperatura de -18°C à -22°C. Após coloração em Oil red O, as fotomicrografias foram registradas em microscópio (Olympus - iX81) em diferentes filtros de luz para salientar a composição do tecido.

Nas fotomicrografias (Figura 22) é possível observar uma série de imagens de ambos os grupos, constituídas em Branco (luz branca); DAPI (Ultravioleta, excitação 365 nm - emissão 420 nm) evidenciando DNA; FL<sub>3</sub> (Azul, excitação 488 nm - emissão 520 nm) marcando em azul-verde tecido muscular liso e em vermelho lipídios; FL<sub>5</sub> (Verde, excitação 550 nm - emissão 590 nm) marcando apenas lipídios em vermelho.

É possível observar a presença do ateroma, indicada pela seta amarela – fotomicrografia de luz branca, no grupo LDL – sick. No entanto, o grupo tratado com choque térmico não apresentou esta formação ateromatosa, logo conclui-se que o ensaio crônico foi efetivo no combate a patologia arterial, melhorando a condição do vaso. Nas imagens, LV indica a *Luz do Vaso*; TM a *Túnica Média*; L a localização de *Lipídios*.

Utilizando o software Image-J, foram realizadas mensurações representativas da espessura do vaso (em amarelo), a formação da placa gera um adito nestes valores quando comparados vaso hígido e doente, os valores foram de 16,2 µm para LDL – heat shock , e 28,5 µm para LDL – sick.

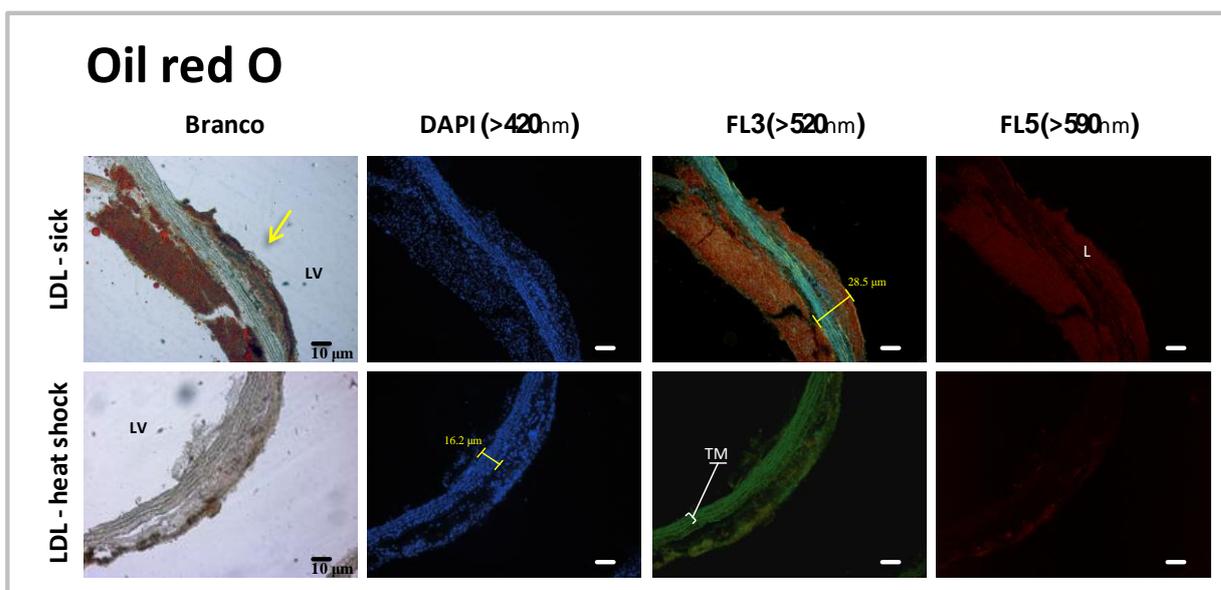


Figura 22. **Fotomicrografias da aorta, efeito do “choque térmico” na formação do ateroma.** Recuperação do vaso doente (LDL – heat shock) quando comparado com seu controle doente (LDL – sick). Coloração em Oil red O e fotomicrografias em Branco (Luz Branca), DAPI (Ultravioleta, excitação (ex.) 365 nm - emissão (em.) 420 nm) para DNA; FL<sub>3</sub> (Azul, ex. 488 nm – em. 520 nm) em azul-verde tecido muscular liso e vermelho lipídios; FL<sub>5</sub> (Verde, ex. 550 nm - em. 590 nm) marcando apenas lipídios em vermelho. Seta (amarela) indicando a placa ateromatosa no grupo doente. LV – luz do vaso; TM – túnica média; L – lipídios. Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL – sick) e choque térmico (LDL - heat shock). Mensuração da espessura do vaso pelo software Image-J. Escala 10μm. Microscópio Olympus iX81. 100X.

### 5.11 Expressões Proteicas no Tecido Aórtico, Alterações do Tratamento com Choque Térmico

A expressão de proteínas potencialmente envolvidas em vários estágios da aterosclerose como no recrutamento de monócitos e linfócitos, ativação do NF-κB, resistência insulínica, inflamação vascular e indução de HSP, foram examinados afim de estabelecer relações com o tratamento crônico de choque térmico.

### 5.11.1 Proteína de Adesão Celular Vascular - 1 (VCAM-1) 122kDa

A expressão de VCAM-1 nas células endoteliais está sob-regulação de citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa e interleucina-1. É a proteína responsável por mediar à adesão de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos para o endotélio vascular. O tratamento com choque térmico reduziu ( $p < 0,01$ ;  $n = 6$ ) a expressão proteica da molécula de adesão celular vascular nas artérias dos animais LDL – heat shock (Figura 23). Os dados foram normalizados com a expressão da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh), e os valores expressos em unidades arbitrárias (UA). O efetivo foi de 0.68 UA para LDL – sick e 0.45 UA para LDL – heat shock (-32,5%).

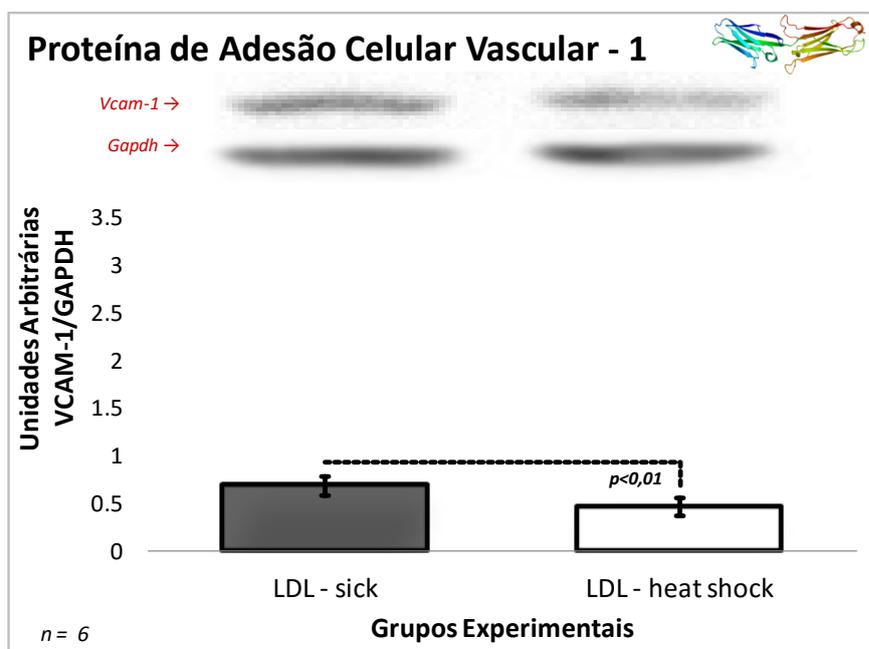


Figura 23. **Imunodeteção de VCAM-1.** Avaliação da expressão de moléculas de adesão celular, 72 horas após última sessão de choque térmico. O tratamento reduziu significativamente ( $p < 0,01$ ) os níveis de VCAM-1 no grupo tratado, LDL – heat shock (-32.5%). Normalização da expressão com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh), e valores expressos em unidades arbitrárias. Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL – sick) e choque térmico (LDL – heat shock). Teste t-Student. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ .

### 5.11.2 Proteína Desacetilase NAD-dependente SIRTUINA – 1 (SIRT-1)

#### 115 kDa

Sirtuina-1 é uma proteína associada à sobrevivência celular e metabolismo, estando envolvido em mecanismos de senescência e apoptose. Atua no metabolismo energético pela regulação da transcrição dos PPARs (receptores ativados por proliferadores de peroxissomos) reprimindo sua expressão, atenuando a adipogênese e melhorando a sensibilidade à insulina.

Fora observada uma superexpressão de SIRT-1 ( $p < 0,001$ ;  $n = 6$ ) nas artérias dos animais tratados com choque térmico (Figura 24). O grupo LDL – sick apresentou 0.56 UA e o grupo LDL – heat shock 1.74 UA (+210,7%). Os dados foram normalizados com Gapdh.

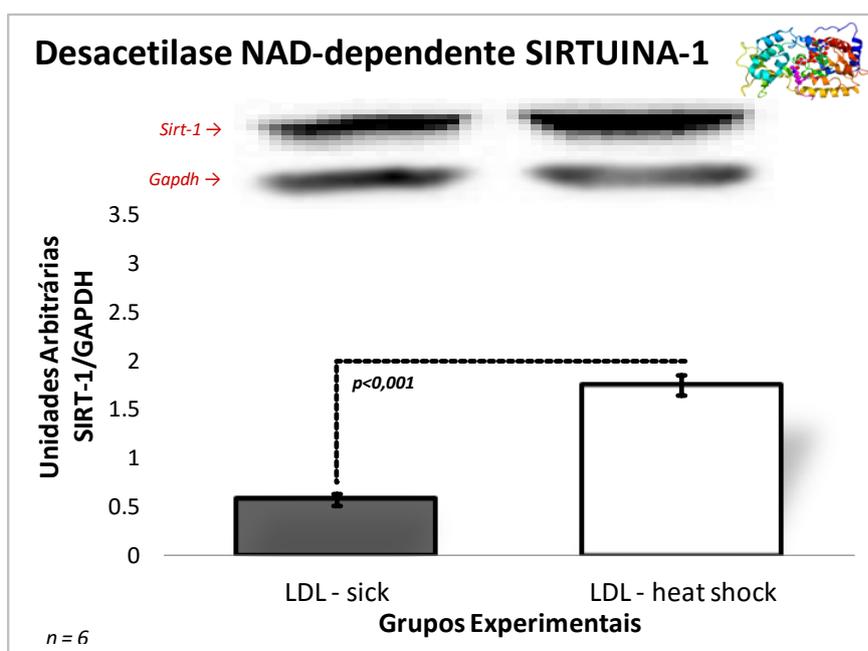


Figura 24. **Imunodeteção de SIRTUINA-1.** Avaliação da expressão de sirtuína-1, 72 horas após última sessão de choque térmico. O “choque térmico” induziu uma superexpressão ( $p < 0,001$ ) dos níveis de SIRT-1 no grupo tratado, LDL – heat shock (+210,7%). Normalização da expressão com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh), e valores expressos em unidades arbitrárias. Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL – sick) e choque térmico (LDL – heat shock). Teste t-Student. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ .

### 5.11.3 Proteína do Fator de Choque Térmico – 1 (HSF1) 60 kDa

Toda regulação da resposta do choque térmico é mediada por um ativador transcricional, o fator de choque térmico – HSF. Esta proteína se liga ao elemento regulador de choque térmico – HSE, presente virtualmente em todos os genes promotores. A indução do choque térmico converte reversivelmente o HSF monomérico, num estado trimérico, que adquire alta afinidade pelo DNA se ligando no HSE dos genes responsivos ao choque térmico aumentando a expressão de HSPs.

Após oito semanas de choque térmico e transcorridas 72 horas da última sessão, a expressão de HSF-1 estava significativamente elevada ( $p < 0,001$ ;  $n = 6$ ) nos animais LDL – heat shock (Figura 25), um aumento condizente a 100% dos valores médios de  $0,21 \pm 0,04$  UA do grupo LDL – sick.

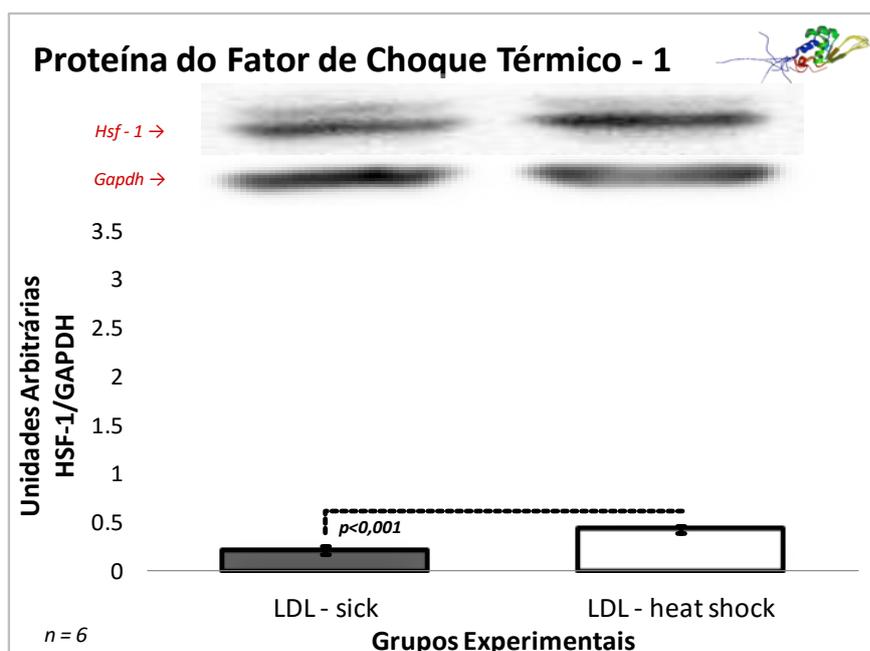


Figura 25. **Imunodeteção de HSF-1.** Avaliação da expressão do fator de choque térmico-1, 72 horas após última sessão do tratamento crônico. O “choque térmico” levou a um aumento dos níveis de HSF-1 no grupo tratado ( $p < 0,001$ ). A expressão foi o dobro de unidades arbitrárias (UA) apresentadas pelo controle doente LDL – sick ( $0,21 \pm 0,04$  UA). Normalização da expressão com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh). Grupos experimentais controle aterosclerótico (LDL – sick) e choque térmico (LDL – heat shock). Teste t-Student. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ .

#### 5.11.4 Proteína de Choque Térmico (HSP) 70 kDa

As imunodeteccões demonstraram um notável aumento na expressão de HSF-1 após as oito semanas de tratamento, acompanhada de uma visível melhora da condição do vaso, logo, supomos que as HSPs também estivessem elevadas. As HSPs são divididas em famílias, segundo a sua massa molecular (HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e HSP30). A família mais conservada e estudada é a com peso molecular de 70 kDa (HSP70), e do ponto de vista cardiovascular são muito importantes porque as HSP70 mantêm uma relação inversa com a placa de aterosclerose, tendo seus níveis elevados em indivíduos não doentes.

As avaliações de HSP70 ocorreram 72 horas após a última sessão de choque térmico. Sua imunodeteccção foi significativamente elevada, o aumento da expressão proteica foi de 50.8% nos animais submetidos ao tratamento com choque térmico (LDL – heat shock) (Figura 26). Os valores arbitrários foram de 1.81 UA para LDL – sick e 2.73 UA para o grupo tratado ( $p < 0,001$ ;  $n = 6$ ). Os dados foram normalizados com Gapdh.

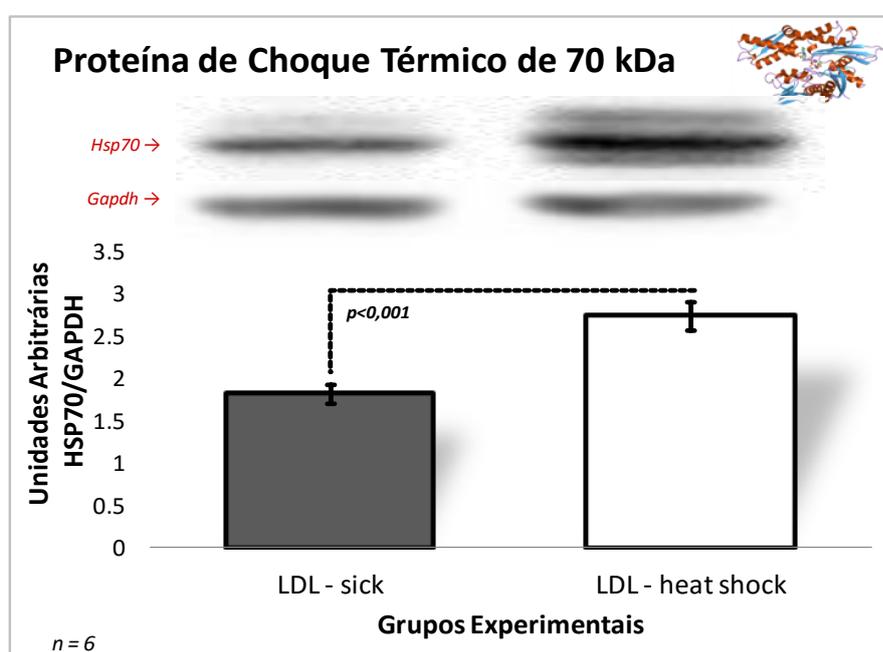


Figura 26. **Imunodeteccção de HSP70.** Avaliação da expressão da proteína de choque térmico de 70 kDa, 72 horas após última sessão do tratamento crônico. O “choque térmico” aumentou (+50,8%) a expressão dos níveis de HSP70 no grupo tratado ( $p < 0,001$ ). Grupo doente LDL – sick (1.81 unidades arbitrárias - UA); Grupo tratado LDL – heat shock (2.73 UA). Normalização da expressão com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh). Teste t-Student. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ .

### 5.11.5 Proteína de Choque Térmico (HSP) 72 kDa

As HSP70 são divididas em duas formas a constitutiva de 73 kDa (HSC70 ou HSP73) e a induzível de 72 kDa (HSP70 ou HSP72). A forma constitutiva é sintetizada por grande parte das células e é moderadamente induzível, sendo constitutivamente expressa em condições basais. No entanto, a forma induzível embora em menor concentração nas células, pode ser rapidamente sintetizada frente a determinados “estímulos” como o choque térmico.

A imunodeteccção de HSP72 (Figura 27) realizada segundo os mesmos critérios das demais análises apresentou um aumento de 37,9% da sua expressão nas artérias dos animais submetido as oito semanas de choque térmico (LDL – heat shock). Os valores arbitrários da análise foram de 1.37 UA para LDL – sick e 1.89 UA para LDL – heat shock ( $p < 0,01$ ;  $n = 4$ ).

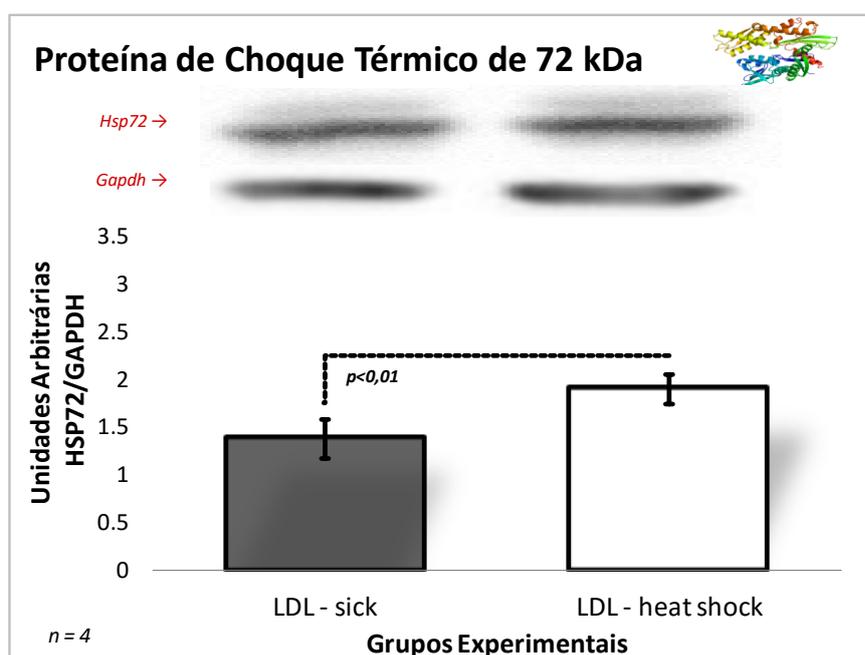


Figura 27. **Imunodeteccção de HSP72.** Avaliação da expressão da proteína de choque térmico de 72 kDa (induzível), 72 horas após última sessão do tratamento crônico. O “choque térmico” aumentou (+37,9%) a expressão dos níveis de HSP72 no grupo tratado ( $p < 0,01$ ). Grupo doente LDL – sick (1.37 unidades arbitrárias - UA); Grupo tratado LDL – heat shock (1.89 UA). Normalização da expressão com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh). Teste t-Student. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 4$ .

### 5.11.6 Proteína de Choque Térmico (HSP) 27 kDa

A HSP27 é conhecida por ser uma proteína intracelular ubíqua, expressa por diversos tipos celulares, incluindo as células vasculares. A redução dos seus níveis está diretamente ligada com o quadro aterosclerótico, o que lhe dá um importante papel como potencial marcador do estado saudável da parede vascular.

O tratamento crônico com choque térmico elevou a expressão de HSP27 (+142,8%) (Figura 28). A imunodeteção 72 horas após a última sessão foi de 0.28 UA para LDL – sick e 0.68 UA para o grupo LDL – heat shock ( $p < 0,001$ ;  $n = 6$ ).

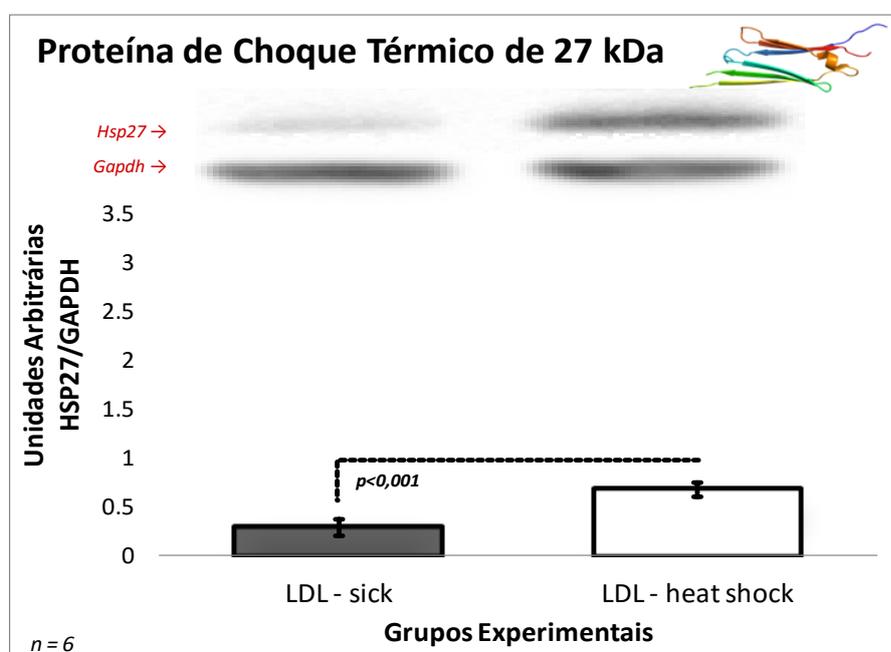


Figura 28. **Imunodeteção de HSP27.** Avaliação da expressão da proteína de choque térmico de 27 kDa, 72 horas após última sessão do tratamento crônico. O “choque térmico” aumentou (+142,8%) a expressão dos níveis de HSP27 no grupo tratado ( $p < 0,001$ ). Grupo doente LDL – sick (0.28 unidades arbitrárias - UA); Grupo tratado LDL – heat shock (0.68 UA). Normalização da expressão com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh). Teste t-Student. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ .

### 5.12 Concentrações Plasmática de HSP70 (*induzível*) – HSP72

Nossos dados demonstraram que a expressão aórtica de HSPs (HSP72; HSP27) foi elevada em resposta ao tratamento crônico com choque térmico, por isso buscamos avaliar a concentração plasmática desta proteína. Na literatura relata-se que os níveis séricos elevados de HSP70 estão associados com um risco reduzido de doença arterial coronária, e que as suas concentrações diminuíram em pacientes com aterosclerose carotídea em relação aos controles saudáveis.

As concentrações circulantes de HSP72 foram de  $0,44 \pm 0,08$  ng/mL para o grupo doente (LDL – sick) e  $0,85 \pm 0,2$  ng/mL para o grupo que recebeu o choque térmico (LDL – heat shock), este aumento na concentração equivale um adito de 100% ( $p < 0,001$ ;  $n = 8$ ) das concentrações apresentada por um animal doente (Figura 29). Concentrações médias acompanhada de desvio padrão.

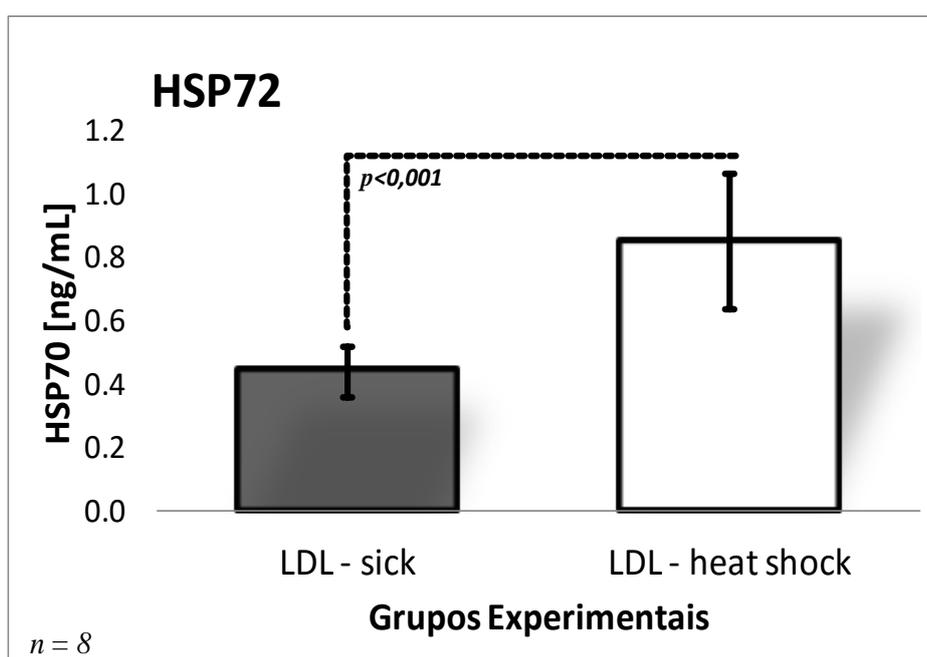


Figura 29. **Concentração plasmática de HSP72.** Avaliação dos níveis circulantes da proteína de choque térmico de 72 kDa (*induzível*), 72 horas após última sessão do tratamento crônico. O “choque térmico” aumentou (+100%) a concentração dos níveis de HSP72 no grupo tratado ( $p < 0,001$ ). Grupo doente LDL – sick ( $0,44 \pm 0,08$  ng/mL); Grupo tratado LDL – heat shock ( $0,85 \pm 0,2$  ng/mL). Kit HSP70 (*Enzo Life Science*), Elisa 450 nm. Teste t-Student. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 8$ .

### 5.13 Ativação Nuclear de NF- $\kappa$ B

Alguns estudos têm demonstrado que a HSP70 regula negativamente o NF- $\kappa$ B, estabelecendo, assim, uma ligação mecânica direta entre HSP70 e NF- $\kappa$ B numa cascata de sinalização. A capacidade da HSP70 para inibir a sinalização de NF- $\kappa$ B é creditada na sua ligação com a subunidade regulatória IKK $\gamma$ , do complexo IKK, que assim impede a ativação (fosforilação) do I $\kappa$ B mantendo o NF- $\kappa$ B no citoplasma, impedindo sua transcrição.

O aumento dos níveis de HSPs (*item 5.12*), nos levaram a acreditar que parte do processo inflamatório causador da aterosclerose, dependente do NF- $\kappa$ B pudesse estar sendo modulado pelas HSPs nos animais que receberam o tratamento crônico de choque térmico. Para isso avaliamos a fração nuclear de NF- $\kappa$ B nos grupos estudados.

Os resultados observados como unidades arbitrárias (UA) de ativação, foram significativamente ( $p < 0,01$ ;  $n = 5$ ) reduzidos (-75,3%) para os animais do grupo LDL – heat shock. Os valores absolutos foram de  $0,97 \pm 0,2$  UA pra LDL – sick e  $0,24 \pm 0,03$  UA para os animais tratados (Figura 30).

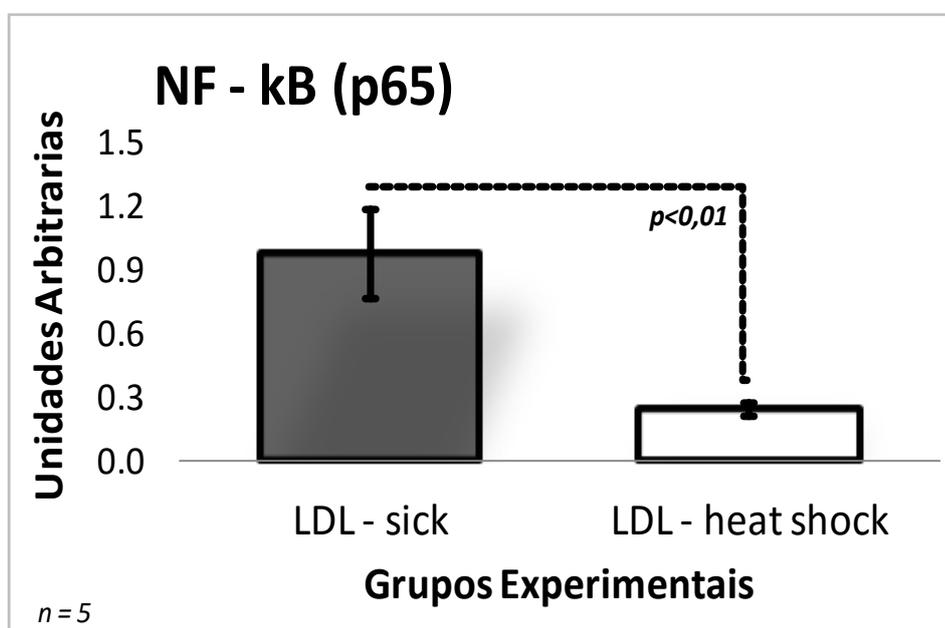


Figura 30. **Ativação Nuclear de NF- $\kappa$ B.** Avaliação dos níveis nucleares de ativação do fator de transcrição nuclear kappa B em unidades arbitrárias (UA), 72 horas após última sessão de tratamento crônico de oito semanas. O “choque térmico” reduziu (-75,3%) a ativação nuclear no grupo tratado ( $p < 0,01$ ). Grupo doente LDL – sick ( $0,97 \pm 0,2$  UA); Grupo tratado LDL – heat shock ( $0,24 \pm 0,03$  UA). Kit NF- $\kappa$ B (Cayman Chemical Company), Elisa 450 nm. Teste t-Student. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 5$ .

### 5.14 Avaliações Ecocardiográficas em Doppler Pulsátil e Modo – M

Para finalizar as análises e estimar o efeito global do tratamento crônico com choque térmico, os animais foram submetidos a três avaliações ecocardiográficas Doppler, a saber, uma anterior ao início dos procedimentos de choque térmico, uma segunda avaliação depois de transcorridos quatro semanas de tratamento e finalmente uma última avaliação no final das oito semanas de tratamento. Todos os procedimentos para ecocardiografia Doppler ocorreram 72 horas após a realização da sessão de choque térmico, ou 72 horas anteriores ao procedimento (para a primeira avaliação).

As análises foram realizadas em ecocardiógrafo Philips – HD7 XE, com transdutor de 4-12 MHz em oito animais de cada grupo experimental. As aquisições de fluxo ecocardiográfico pulsátil foram realizadas em: artéria pulmonar com ângulo do cursor Doppler em 0°, e constituíram dados de Tempo de Ejeção Pulmonar (TEP), Tempo de Aceleração Pulmonar (TAP), Relação Aceleração/Ejeção Pulmonar (TAP/TEP), Integral da Curva Pulmonar de Velocidade Tempo (VTI PM) e Índice de Performance Miocárdica Ventricular Direita (IPM VD); aorta com ângulo do cursor Doppler em 60°, para Tempo de Ejeção Aórtico (TEA), Volume de Ejeção Aórtico (VEA), Frequência Cardíaca (FC), Débito Cardíaco (DC) e Integral da Curva Aórtica de Velocidade Tempo (VTI AO); sobre os folhetos valvares mitrais com ângulo do cursor a 60° para aquisição da amplitude da Onda E (E), Onda A (A), Relação E/A (E/A), Tempo de Fluxo Mitral (TFxM), Tempo de Fechamento Mitral (TFM), Tempo de Ejeção Mitral (TEM), Tempo de Desaceleração da Onda E Mitral (TDM) e Índice de Performance Miocárdica Ventricular Esquerda (IPM VE). Ainda aquisições de imagens unidimensionais (eco Modo-M) da primeira porção da aorta, foram usadas para constituírem dados de Diâmetro Arterial Diastólico (DAD), Diâmetro Arterial Sistólico (DAS), Diâmetro da Parede Arterial em Sístole (DPAS), Diâmetro da Parede Arterial em Diástole (DPAD), Relação Espessura/Raio em Sístole (T/RS ratio), Relação Espessura/Raio em Diástole (T/RD ratio), Índice de Distensibilidade Arterial (IDA) e Índice de Distensibilidade da Parede Arterial (IDPA).

A corpora ecocardiográfica demonstrou que a FC reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) no grupo LDL – heat shock quando comparado com o grupo doente no final da oitava semana

de tratamento, valores de  $360,7 \pm 43,5$  bpm e  $313,5 \pm 24$  bpm para LDL – sick e LDL – heat shock respectivamente (Teste t-Student). Já quando comparada a FC nas diferentes leituras ecocardiográficas intra grupo, os animais doentes, apresentaram um aumento ( $p < 0,05$ ) da frequência ao final das oito semanas de tratamento quando comparados com “zero” e quatro semanas, ANOVA (post hoc Tuckey). O grupo LDL – heat shock não apresentou variações na FC ao longo do tratamento (Tabela 3).

O grupo LDL – heat shock apresentou reduções ( $p < 0,05$ ), após o início do tratamento, em parâmetros como DPAS, DPAD, T/RS ratio e T/RD ratio. A redução destes parâmetros resultam no melhoramento dos índices de distensibilidade (IDA e IDPA) nos animais LDL – heat shock quando comparados aos animais LDL – sick.

O perfil mitral do grupo tratado com choque térmico revelou uma redução no enchimento protodiastólico passivo (onda E) na quarta semana de tratamento, esta redução, no entanto, não foi diferente do apresentado no final do tratamento. A relação E/A no grupo tratado reduziu significativamente do tempo “zero” para há oitava semana (de  $1,71 \pm 0,14$  para  $1,56 \pm 0,04$ ). Caracterizando uma melhora do fluxo lento ventricular, que deixou de apresentar um padrão pseudonormal de enchimento.

Quando comparado o perfil mitral entre os dois grupos experimentais, LDL – heat shock demonstrou um aumento da contração atrial (onda A), seguido de uma redução da relação E/A. Esta relação assinalava um enchimento pseudonormal para ambos os grupos no tempo “zero”, e enquanto o grupo tratado evoluiu para um enchimento ventricular normal ( $E/A = 1,56$ ), o grupo doente começou a apresentar, já na quarta semana, um padrão restritivo de enchimento ventricular ( $E/A > 2$ ). Os TDM apresentam os mesmos padrões pseudonormal nos tempos “zero” de ambos os grupos, com alterações do relaxamento miocárdico ( $TDM > 24$  ms) que evoluem para um padrão normal em ambos os grupos ( $TDM < 24$  ms) e atinge um limite crítico (padrão restritivo –  $TDM < 16$  ms) para os animais doentes, enquanto que para o grupo LDL – heat shock, o índice permanece inalterado e normal da quarta à oitava semana de tratamento.

Os tempos de ejeção mitral e aórtico ficaram alterados entre os dois grupos estudados. O TEM aumentou ao final das oito semanas de tratamento no grupo “choque térmico” ( $53,7 \pm 2,5$  ms) quando comparado aos animais do grupo doente ( $42,1 \pm 4,7$  ms). O TEA reduziu

significativamente ( $p < 0,05$ ) nos animais tratados ( $68,3 \pm 4,9$  ms) quando comparados aos controles doente ( $80,1 \pm 6,8$  ms) após a oitava semana, isto implica em uma melhor capacidade de ejeção aórtica, vez que, o VEA foi o mesmo ( $54 \pm 10$   $\mu\text{L}/\text{bpm}$ ) entre os dois grupos.

A performance miocárdica do ventrículo direito e esquerdo (IPM VD e IPM VE) reduziu após o início do choque térmico no grupo LDL – heat shock. O IPM tem um ótimo valor prognóstico por não serem influenciados pela FC, pela geometria cardíaca ou pressão arterial, os valores quando aumentados estão associados à disfunção ventricular e pior prognóstico, especialmente quando acima de 1,0.

O IPM VD do grupo LDL – sick não se alterou ao longo das oito semanas (IPM VD = 0,62), enquanto o IPM VE evoluiu drasticamente indicando um desfecho possivelmente letífero (IPM VE de 0,68 para 1,21). Para o grupo tratado com choque térmico LDL – heat shock, a função ventricular global apresentou uma melhora significativa ( $p < 0,05$ ), tanto o IPM VD quanto o IPM VE apresentaram reduções em seus índices (de 0,63 para 0,4) e (de 0,89 para 0,79) respectivamente.

Parâmetros como DC, DAS, DAD, TFxM, TFM, VEA, TEP, TAP, TEP/TAP e VTI PM não apresentaram diferenças em seus valores em função do tratamento nos e entre os grupos. Dados apresentados na Tabela 3, abaixo.

Tabela 3. **Parâmetros ecocardiográficos de Doppler pulsátil e modo-M.** Análises realizadas em jejum (4 horas), 72 horas após a última sessão de choque térmico (oitava semana). Redução dos índices FC, DPAS, DPAD, T/R ratio, T/RD ratio, E/A, TEA, IPM VD e IPM VE; seguido do aumento de IDA, IDPA, ONDA A e TEM em função do tratamento (LDL – heat shock) quando comprado ao controle aterosclerótico, LDL – sick. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n= 8. \*  $p < 0,05$  Teste t-Student para comparação entre os grupos nos respectivos tempo; †  $p < 0,05$  ANOVA *post hoc* Tuckey *in* grupo, valores diferentes do tempo “zero”; ‡  $p < 0,05$  ANOVA *post hoc* Tuckey *in* grupo, valores diferentes dos tempos “zero” e 8 semanas. Onde **TEP** = Tempo de Ejeção Pulmonar, **TAP** = Tempo de Aceleração Pulmonar, **TAP/TEP** = Relação Aceleração/Ejeção Pulmonar, **VTI PM** = Integral da Curva Pulmonar de Velocidade Tempo, **IPM VD** = Índice de Performance Miocárdica Ventricular Direita, **TEA** = Tempo de Ejeção Aórtica, **VEA** = Volume de Ejeção Aórtica, **FC** = Frequência Cardíaca, **DC** = Débito Cardíaco, **VTI AO** = Integral da Curva Aórtica de Velocidade Tempo, **E** = Onda E, **A** = Onda A, **E/A** = Relação onda E / onda A, **TFxM** = Tempo de Fluxo Mitral, **TFM** = Tempo de Fechamento Mitral, **TEM** = Tempo de Ejeção Mitral, **TDM** = Tempo de Desaceleração da Onda E Mitral, **IPM VE** = Índice de Performance Miocárdica Ventricular Esquerda, **DAD** = Diâmetro Arterial Diastólico, **DAS** = Diâmetro Arterial Sistólico, **DPAS** = Diâmetro

da Parede Arterial em Sístole, **DPAD** = Diâmetro da Parede Arterial em Diástole, **T/RS ratio** = Relação Espessura / Raio em Sístole, **T/RD ratio** = Relação Espessura / Raio em Diástole, **IDA** = Índice de Distensibilidade Arterial e **IDPA** = Índice de Distensibilidade da Parede Arterial.

### CARACTERÍSTICAS ECORADIOGRÁFICAS DOPPLER PULSÁTIL e MODO M

Parâmetros	LDL - sick (n=8)			LDL - heat shock (n=8)		
	zero	4 semanas	8 semanas	zero	4 semanas	8 semanas
FC (bpm)	281.3 ± 48.5	337.5 ± 63.3†	360.7 ± 43.5†	291.2 ± 47.6	300.6 ± 47.8	313.5 ± 24.0*
DC (mL/min)	178.4 ± 46.2	187.3 ± 56.2	197.3 ± 46.9	197.8 ± 33.1	164.91 ± 27.5	172.1 ± 37.3
DAS (µm)	132.2 ± 9.3	132.1 ± 9.1	140.5 ± 23.9	140.2 ± 13.3	140.5 ± 10.5	138.3 ± 15.2
DAD (µm)	106.8 ± 7.2	109.3 ± 12.5	123.0 ± 22.8	104.4 ± 7.8	110.5 ± 11.0	109.0 ± 12.9
DPAS (µm)	21.0 ± 6.5	20.3 ± 1.2	22.4 ± 3.2	29.4 ± 7.1	20.4 ± 2.9†	19.0 ± 3.7†
DPAD (µm)	32.2 ± 8.9	28.4 ± 2.0	29.3 ± 2.9	40.0 ± 5.4	30.5 ± 3.4†	29.3 ± 4.5†
T/RS ratio	0.16 ± 0.05	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.04	0.21 ± 0.06	0.14 ± 0.02†	0.13 ± 0.03†
T/RD ratio	0.29 ± 0.06	0.26 ± 0.03	0.25 ± 0.07	0.38 ± 0.06	0.27 ± 0.01†	0.27 ± 0.05†
IDA	25.3 ± 9.3	22.8 ± 8.6	17.6 ± 8.5†	35.8 ± 13.4	30.0 ± 13.1	29.3 ± 11.8*
IDPA	-11.2 ± 4.8	-8.1 ± 3.1	-6.8 ± 1.1	-10.6 ± 2.3	-10.1 ± 1.5*	-10.3 ± 3.2*
E (cm/s)	104.1 ± 11.5	112.0 ± 9.6	115.9 ± 11.7	116.4 ± 13.2	103.7 ± 8.6†	114.3 ± 3.1
A (cm/s)	60.55 ± 7.7	58.7 ± 20.9	51.9 ± 10.8	68.45 ± 11.3	63.9 ± 6.4	73.2 ± 2.3*
E/A	1.73 ± 0.21	2.23 ± 1.07	2.32 ± 0.61	1.71 ± 0.14	1.62 ± 0.15	1.56 ± 0.04*†
TFxM (ms)	99.7 ± 11.0	95.3 ± 24.9	72.3 ± 15.9†	91.0 ± 26.5	95.5 ± 23.1	91.7 ± 9.4
TFM (ms)	104.4 ± 13.1	97.5 ± 10.2	92.6 ± 4.9	109.8 ± 14.7	107.9 ± 18.7	96.2 ± 7.6
TEM (ms)	62.3 ± 9.7	55.6 ± 11.5	42.1 ± 4.7†	58.4 ± 6.4	57.5 ± 5.0	53.7 ± 2.5*
TDM (ms)	26.7 ± 2.8	20.3 ± 1.5†	15.1 ± 1.3†	25.6 ± 2.3	23.9 ± 1.4*	18.8 ± 1.7*†
IPM VE	0.68 ± 0.10	0.74 ± 0.14	1.21 ± 0.20†	0.89 ± 0.27	0.87 ± 0.28	0.79 ± 0.15*
TEA (ms)	68.6 ± 6.2	78.9 ± 11.2†	80.1 ± 6.8†	71.6 ± 12.9	79.1 ± 15.8	68.3 ± 4.9*
VEA (µL)	60 ± 17	53 ± 7	54 ± 10	63 ± 6	53 ± 8	54 ± 10
VTI AO	6.12 ± 1.09	5.79 ± 0.67	5.67 ± 0.62	6.63 ± 0.82	5.31 ± 0.76†	5.45 ± 0.30†
TEP (ms)	72.0 ± 11.3	79.3 ± 12.8	70.9 ± 10.5	73.6 ± 21.4	76.3 ± 15.7	69.6 ± 4.8
TAP (ms)	22.4 ± 5.3	22.8 ± 4.3	19.7 ± 3.4	19.4 ± 2.6	21.3 ± 4.6	19.3 ± 1.3
TAP/TEP	0.31 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.05	0.27 ± 0.06	0.28 ± 0.03	0.27 ± 0.02
VTI PM	2.31 ± 0.38	2.22 ± 0.24	2.12 ± 0.21	2.25 ± 0.59	2.12 ± 0.24	2.35 ± 0.41
IPM VD	0.62 ± 0.37	0.62 ± 0.21	0.62 ± 0.14	0.63 ± 0.15	0.42 ± 0.07†	0.40 ± 0.13*†

# Discussão



## 6. DISCUSSÃO

As proteínas de choque térmico – HSPs foram inicialmente identificadas como proteínas responsivas ao estresse, necessárias para lidar com a temperatura (febre) e outros estresses proteotóxicos. Desde então, os genes de choque térmico, e as proteínas membros das famílias que eles codificam (proteínas induzíveis - HSPi), tais como HSP72 e HSP27 têm sido extensivamente estudadas (BROCCHIERI, *et al.*, 2008). Diferentes grupos de pesquisa têm analisado os níveis de HSPs circulantes, nas dislipidemias e outras patologias que afetam o sistema cardiovascular, e o que se têm observado, é que os níveis de HSPs aparecem aumentados em pacientes com aterosclerose, sugerindo seu papel potencial como biomarcador diagnóstico para a doença (POCKLEY & SHEPHERD, *et al.*, 1998; XU, *et al.*, 2000; POCKLEY, *et al.*, 2000).

Das alterações que ocorrem na aterosclerose, a principal modificação responsável por induzir a expressão de HSPs na parede arterial, é a LDL em sua forma integral e oxidada, o que constitui uma resposta à lesão, inflamação (CHEN, *et al.*, 2009). O que podemos encontrar pelos estudos apontados, para além de um papel como biomarcador, é que as HSPs atuam diretamente na linha de frente no combate a injúria endotelial, em um dos principais processos de gênese da placa aterosclerótica, que compreende a migração de CMLV (HELLINGS, *et al.*, 2010). Onde as HSPs interagem com proteínas do citoesqueleto, tais como actina, e modificam o processo de migração impedindo a proliferação (CHEN, *et al.*, 2009). As HSPs também atenuam a ativação do NF- $\kappa$ B, um mediador da resposta inflamatória, inibindo a degradação do I $\kappa$ B (SCHELL, *et al.*, 2005).

Embora pareça lógico que o papel das HSPs transcende como biomarcadores no diagnóstico às DCVs, e que sua ação no combate a evolução da placa aterosclerótica se dá em várias etapas, até o momento nenhum estudo têm apontado o uso terapêutico de HSPs (induzíveis) como forma de mitigar os agravos decorrentes do processo inflamatório na aterosclerose. Madrigal - Matute e colaboradores (2011), referem-se às HSPs em sua obra, como proteínas essenciais ao combate e proteção ao organismo em várias condições de estresse, mencionando a expectativa do seu uso como estratégia terapêutica na doença cardiovascular, indicando as vantagens devido à simplicidade e viabilidade na modulação da

sua expressão. Entretanto segundo os autores, esta estratégia de tratamento com choque térmico poderia produzir uma superexpressão de HSPs, mas o seu impacto sobre doenças crônicas, tais como aterosclerose poderia ser bastante limitada. No nosso trabalho demonstramos que o aumento das HSPi, em condições de choque térmico (estresse por hipertermia) de exposição crônica, durante oito semanas, foi capaz de induzir via anti-inflamatória na parede arterial, melhorando o fluxo sanguíneo e aumentando a expectativa de vida de camundongos com aterosclerose.

O modelo de choque térmico por nós utilizado tem sido aplicado em experimentos pré-clínicos e clínicos de investigação acerca do papel das HSPi principalmente em modelos de obesidade e resistência a insulina. Entre estes estudos, citamos os do grupo de pesquisa de Chung e colaboradores (2008), do Laboratório do Prof. Mark Febbraio da Austrália, do qual adaptamos a técnica aplicada. Os resultados da análise do conteúdo de HSP72 no plasma e expressão aórtica, dos animais submetidos ao choque térmico (grupo LDL – heat shock) mostraram que as condições experimentais utilizadas foram capazes de causar aumento da expressão (Figuras 26, 27) e concentração de HSP72 (Figura 29), e que estes níveis continuaram aumentados para além das 72 horas após a última sessão de choque térmico.

A regulação da resposta ao choque térmico é mediado por um ativador transcricional, o HSF, que se liga ao seu elemento regulador de choque térmico - HSE presente em todos os genes promotores. Em condições basais, o HSF está presente nas células na forma de monômero, e se liga ao DNA com baixa afinidade, entretanto, em condições de estresse, como no choque térmico, o HSF é convertido de forma reversível ao estado trimérico, e adquire alta afinidade pelo DNA, se ligando no HSE presente nos promotores dos genes responsivos ao estresse, aumentando, a expressão gênica de HSP induzíveis (OROSZ E BENJAMIN, 2007; AKERFELT *et al.*, 2010). A imunodeteção da expressão de HSF-1 em nosso modelo de choque térmico apresentou uma elevação de 100% dos valores desta proteína nos animais LDL – heat shock, quando comparados com os animais doentes ateroscleróticos. Estes dados vão de encontro com a alta expressão e concentração de proteínas de choque térmico (induzíveis) detectadas experimentalmente em nosso trabalho.

Ficou claro para nós, antes mesmo de realizarmos qualquer investigação a nível metabólico, que o tratamento crônico com choque térmico trouxe para os animais submetidos ao procedimento, melhores condições de saúde e integridade física, como pode ser observado

nas imagens (Figura 12) que apresentam as características macroscópicas externas da epiderme dos animais. É característico do modelo animal utilizado (aterosclerose), apresentar danos epidérmicos principalmente em regiões distais como orelhas e cauda, causadas pela grave perda da microcirculação periférica, o que acarreta no aparecimento de grandes regiões necróticas como as observadas no grupo LDL – sick no 270° dia. Danos estes que desapareceram nos animais submetidos ao tratamento e que deram sinais de estarem sendo amenizados a partir da segunda semana de choque térmico.

A melhora dos danos epidérmicos foi acompanhada por outro dado que nos chamou muita à atenção, o fato de que os animais que receberam choque térmico deixaram de apresentar eventos de morte, enquanto que o grupo doente aterosclerótico apresentava semanalmente depauperamentos causados pelo agravamento da condição patológica. Ao todo no grupo aterosclerótico (LDL – sick) perdemos 19 animais até o final do tratamento. Estes números caíram drasticamente para seis animais, no grupo choque térmico. Estes dados quando submetidos aos testes de hipótese de Kaplan – Meier nos indicam um aumento na expectativa de vida que passa de 65% para 83%, quando comparado LDL – sick com LDL – heat shock.

Ao acompanharmos o quadro clínico da aterosclerose durante o tratamento, foi possível notar que o choque térmico reduziu o ganho de massa corporal dos animais ao longo das semanas (Figuras 7-8) e reduziu o índice de Lee (razão nutricional) em 7% (Figura 9). Embora pareça uma diferença “irrisória” na perda de massa corporal total, é representativamente colossal no tamanho do depósito de tecido adiposo, reduzindo mais de 50% a taxa de deposição de gordura epididimal (Figura 19). Todas essas reduções de conteúdo lipídico livraram os animais tratados com choque térmico dos efeitos causados pelos danos hepáticos, como hipertrofia e esteatose, observados a nível macroscópico neste tecido (Figura 17).

A hipertrofia hepática causada pela congestão sanguínea (Figura 16), e observada pelo aumento da massa do fígado (+15%) quando comparado com o grupo tratado, pode ser confirmada pelo padrão pseudonormal de enchimento ventricular, avaliado em Doppler (Tabela 3), apresentado por este grupo. O perfil de enchimento cardíaco ventricular, apontado pela relação entre o pico da onda E (enchimento protodiastólico passivo) e onda A (contração atrial), evolui ao longo do agravamento da doença de um padrão pseudonormal para um

padrão de enchimento restritivo (relação E/A > 2), esta grave alteração que contribui para a congestão hepática acontece pela perda da integridade da contração atrial e desaparecimento da onda A em grande parte dos animais doentes do nosso estudo.

O tratamento, ao alterar os depósitos de gordura como apresentado acima, modificaram também o perfil de lipídios circulantes dos animais LDL – heat shock. As reduções apresentadas nos níveis lipídicos de triglicérides (-35%) e colesterol total (-42%) neste grupo, foram acompanhadas pelo aumento das lipoproteínas de densidade alta, que passaram de 0,58 mM/L (LDL - sick) para 1,02 mM/L (LDL – heat shock), representando um aumento de mais de 75% da concentração desta lipoproteína. Os níveis de lipoproteínas de densidade muito baixa e de densidade baixa (LDL) reduziram seus níveis circulantes em 35% e 47,5% respectivamente (Tabela 1). Spady (1999) descreve que o influxo de colesterol na parede arterial, pode ser controlado através da diminuição da concentração plasmática de lipoproteínas de densidade baixa, e que embora a progressão da doença seja normalmente retardada ou interrompida por redução drásticas do consumo e conteúdo lipídico e/ou por mecanismos de transporte reverso mediado por HDL, à regressão de lesões pré-existentes é relativamente rara, salva exceções de grandes ativações metabólicas.

Nossos dados nos levam a acreditar que alterações neste contexto tenham acontecido em virtude do tratamento com choque térmico. Uma destas ‘provas’ pode ser creditada ao aumento da expressão observada na imunodeteção da SIRTUINA-1 (proteína desacetilase NAD-dependente) (Figura 24), moduladora do metabolismo e sobrevivência celular. Picard e colaboradores (2004), demonstraram que a superexpressão da SIRT-1 atenua a adipogênese em células 3T3-L1 (pré-adipócitos), reprimindo a expressão dos receptores gama ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR $\gamma$ ). E Xiuyun Hou e colaboradores (2008) demonstrou que a ativação de SIRT1 diminui o acúmulo de lipídios no fígado. Isso aconteceria porque os PPARs são fatores de transcrição da família de receptores nucleares, envolvidos com a modulação do metabolismo, e devido sua importância têm sido alvo de vários estudos para o tratamento de doenças metabólicas (TAVARES *et al.*, 2007).

Sun e pesquisadores (2007) evidenciaram que SIRT-1 é regulada negativamente em células que têm alta resistência insulínica e ao induzir a sua expressão, ocorre um aumento da sensibilidade à insulina, sugerindo que esta proteína está associada ao aumento da sensibilidade a este hormônio. Estes dados, vão de encontro aos resultados por nos obtidos

nos testes de tolerância a insulina (IP ITT) e a Glicose (IP GTT) (Figuras 14 e 13 respectivamente). Os animais que fizeram choque térmico apresentaram uma melhor resposta a insulina demonstrando um aumento significativo da sensibilidade ao hormônio, quando comparado aos animais sem tratamento (LDL – sick). O mesmo padrão de resposta foi encontrado nos animais pelo teste glicídico, onde o grupo choque térmico demonstrou uma melhor tolerância à sobrecarga de glicose, diferentemente do grupo doente que apresentou uma elevada resistência à mesma. Todos esses resultados foram confirmados com os cálculos de área sob a curva (para IP GTT) e área incremental sobre a curva (IP ITT).

Além disso, Finkel & Holbrook (2000) demonstraram que o aumento de SIRT-1 afeta diretamente o consumo de oxigênio, reduzindo-o. Tendo em conta que o consumo de oxigênio está ligado à geração de espécies reativas de oxigênio e níveis de espécies reativas de oxigênio estando correlacionados com os processos inflamatórios e de dano celular, como na aterosclerose, estes resultados podem ter implicações importantes para a forma como as sirtuínas regulam o envelhecimento, evolução e fatores de transcrição reguladores no metabolismo do ateroma. Nesta perspectiva demonstramos que o choque térmico foi responsável por reduzir o dano lipídico por lipoperoxidação – LPO, em  $\approx 40,6\%$  no grupo LDL – heat shock (Figura 20), essa redução dos níveis de LPO podem ser em parte explicados pela superexpressão de SIRT-1, como também podem ser atribuídos a menor produção de NO pelo endotélio vascular.

O NO gerado pelo quadro aterosclerótico pode reagir rapidamente com oxigênio e formar anidrido nitroso ( $N_2O_3$ ) e outros compostos N-nitroso visto que o NO é uma Espécie Reativa de Nitrogênio – ERN, um dos radicais livres responsáveis pelo estresse oxidativo causador de uma série de danos celulares incluindo a LPO (NAPOLI *et al.*, 2006). Ao avaliarmos a produção de NO pelo endotélio, a partir dos níveis de nitrato e nitrito (teste baseado no fato de que sua inativação ocorre indiretamente através da combinação com o heme da hemoglobina na presença de oxigênio, sendo convertido a nitrato, ou pela oxidação direta sendo convertido a nitrato e nitrito), podemos concluir que o choque térmico reduziu os níveis de NO, por apresentar concentrações totais de nitratos e nitritos 42% inferiores ao grupo sem tratamento. As relações entre estas concentrações de nitratos e nitritos  $[NO_3^-]/[NO_2^-]$ , mostraram que as proporções de  $NO_2^-$  plasmático em relação ao  $NO_3^-$  são maiores no grupo LDL – sick (1:11) quando comparado ao grupo tratado, LDL – heat shock (1:2). Esses dados demonstram haver, uma tendência à normalização do desvio da reação

$\text{NO}_3$  (nitrato)  $\leftrightarrow$   $\text{NO}_2$  (nitrito) para a direita, com maior formação de  $\text{NO}_2^-$  em virtude do tratamento nos animais LDL – heat shock.

Na perspectiva do vaso, isso representa uma melhora da sua condição elástica, haja vista que devido ao agravamento da aterosclerose têm-se um espessamento da parede arterial, e na tentativa de reestabelecer sua capacidade distensível, aumenta-se a síntese deste nitrovasodilatador. Nós observamos que o tratamento com choque térmico reduziu a deposição lipídica sobre a superfície endotelial arterial de 57,9% no grupo doente, para 26,2% da área total no grupo tratado (Figura 21). As fotomicrografias (Figura 22) da artéria também revelaram que além da redução da deposição lipídica, observa-se uma diminuição do espessamento da parede arterial de 28,5 para 16,2  $\mu\text{m}$ , em decorrência do tratamento. Resultados similares a estes foram descritos por Okada e colaboradores (2004), utilizando ratos macho Sprague-Dawley de 10 semanas de idade, mantidos numa dieta normal, e submetidos à lesão arterial (artéria femoral) por inserção de um balonete *cuff* (para causar espessamento da camada íntima), após 4 semanas de banhos de choque térmico diários, com os ratos submetidos a imersões por 15 minutos em água quente (40,5°C - 41,5°C) e temperatura retal média sendo elevada de 35°C para 38°C, os autores demonstrou pela primeira vez que o tratamento térmico atenua o espessamento neo-intimal num modelo de lesão arterial. Os principais mecanismos estavam sendo mediados por um aumento da expressão de HSP72 e da supressão de estresse oxidativo.

Imamura e colaboradores (2001) relatou que tratamento de calor repetidos em sauna, melhorou a função endotelial vascular, bem como a função cardíaca em pacientes com insuficiência cardíaca crônica, o tratamento térmico suprimiu a proliferação de células vasculares e inibiu a necrose de CMLV, no entanto não foi possível deixar claro se a terapia térmica afetava o desenvolvimento da aterosclerose. Tem sido unanimemente aceito que a adesão e migração de monócitos / macrófagos na íntima, desempenham um papel importante na iniciação da aterosclerose, neste sentido o que demonstramos é que a terapia crônica de choque térmico reduziu a expressão de proteínas de adesão de células vasculares (VCAM-1) (Figura 23), nas imunodeteccões, o choque térmico suprimiu (-32%) a representatividade desta proteína na superfície endotelial.

Quanto à função vascular, nossos dados, obtidos através de parâmetros Doppler, nos permitem concluir que o tratamento com choque térmico, foi capaz de alterar vários índices

cardíacos, como os tempos de ejeção mitral e aórtico, que ficaram alterados entre os dois grupos estudados. O TEM aumentou ao final das oito semanas de tratamento no grupo choque térmico ( $53,7 \pm 2,5$  ms) quando comparado aos animais do grupo doente ( $42,1 \pm 4,7$  ms). A redução do tempo de ejeção nos animais não tratados, pode ser em parte explicado pela perda contração atrial (onda A) na evolução do quadro aterosclerótico nestes animais. O TEA reduziu nos animais tratados ( $68,3 \pm 4,9$  ms) quando comparados aos controles doente ( $80,1 \pm 6,8$  ms) após a oitava semana, isto implica em uma melhor capacidade de ejeção aórtica, vez que, o volume ejetado foi o mesmo ( $54 \pm 10$   $\mu$ L/bpm) entre os dois grupos.

A performance miocárdica do ventrículo direito e esquerdo (IPM VD e IPM VE) é um índice que incorpora em seu cálculo variáveis sistólicas e diastólicas, e é totalmente independente da frequência cardíaca, geometria ventricular e pós-carga. Os seus valores possuem grandezas inversas e quanto maior for o índice, pior é o seu prognóstico. Estas ressalvas são importantemente citadas porque como observado na Tabela 3, os animais apresentaram diferenças significativas na FC entre os dois grupos, e conforme visto na avaliação de hipertrofia ventricular (Figura 18), os animais LDL – sick apresentaram aumentos significativos destes parâmetros.

O IPM VD do grupo LDL – sick (animais não tratados) não se alterou ao longo das oito semanas (IPM VD = 0,62), enquanto o IPM VE evoluiu drasticamente indicando um desfecho possivelmente letífero (IPM VE de 0,68 para 1,21). Para o grupo tratado com choque térmico LDL – heat shock, a função ventricular global apresentou uma melhora significativa ( $p < 0,05$ ), tanto o IPM VD quanto o IPM VE apresentaram reduções em seus índices (de 0,63 para 0,4) e (de 0,89 para 0,79) respectivamente. Cury e pesquisadores (2003), utilizando modelos animais de diferentes tipos (em tamanho) de infarto do miocárdio, relacionaram a área ventricular infartada com o IPM, e demonstraram que índices acima de 1, correspondem a áreas de infartos de  $\approx 45\%$ .

Estes resultados, em conjunto, demonstram a importância das HSPs para o tratamento da aterosclerose. Durante toda essa resposta inflamatória característica da doença, os macrófagos acumulados na íntima desempenham um papel importante no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas e manutenção do processo inflamatório uma vez que citocinas inflamatórias perivasculares induzem infiltração e constante diferenciação de macrófagos no endotélio. Yoo (2000) demonstrou que a expressão de HSP também esta associada a

mecanismos anti-inflamatórios, por inibir a produção de citocinas. Isto acontece porque a maior parte dos genes que codificam citocinas pró-inflamatórias possui domínio  $\kappa\text{B}$  vinculados as suas regiões promotoras, e suas transcrições são dependentes da ativação do NF- $\kappa\text{B}$ . No entanto as HSPs inibem a ativação do NF- $\kappa\text{B}$ , num processo de estabilização desta molécula no citoplasma, onde as HSPs se ligam e ao I $\kappa\text{B}$ - $\alpha$  e estabilizam este complexo, impedindo sua fosforilação e ativação das IKKs. Este modelo teórico já comprovado foi por nós testado, com a detecção da ativação nuclear de NF- $\kappa\text{B}$ , e observamos que os animais que receberam o choque térmico semanalmente durante 60 dias, apresentaram uma redução de 75% da ativação nuclear de NF- $\kappa\text{B}$  nas células arteriais (Figura 30).

De modo geral, o tratamento térmico tem um efeito benéfico significativo para proteger o endotélio vascular, seja através da atenuação da acumulação de lipídios sobre a artéria, ou pela redução de citocinas inflamatórias. O que demonstramos em nosso estudo, é que a superexpressão de HSPs, com aumento da expressão de HSP72 e HSP27, melhora o fluxo sanguíneo global e suprime o estresse oxidativo aumentando a expectativa de vida em animais ateroscleróticos, submetidos a um tratamento semanal durante sessenta dias.

# **Conclusão**



## 7. CONCLUSÃO

Nossos dados nos permitem concluir que:

- i. A terapia de choque térmico induz o aumento da expressão e concentração de HSP72 mediada pelo seu ativador transcricional HSF, e ativa via anti-inflamatória atenuando a ativação do NF-kB.
- ii. A superexpressão da proteína desacetilase NAD-dependente – SIRT-1, pode estar ligada a redução da deposição lipídica sobre os depósitos de gordura e sobre o endotélio, alterando as concentrações de lipídios circulantes, e a resposta a sobrecarga glicídica e insulínica.
- iii. O choque térmico suprime o estresse oxidativo reduzindo a produção de nitrato, e os níveis de lipoperoxidação lipídica.
- iv. Melhora a distensibilidade arterial reduzindo o diâmetro da parede endotelial e suprime a expressão de proteínas de adesão das células vasculares – VCAM-1.
- v. O choque térmico reestabelece a integridade do fluxo sanguíneo, reduzindo os índices de performance miocárdica e melhorando a capacidade de relaxamento ventricular e contração atrial.
- vi. No conjunto esses resultados permitem um aumento da expectativa de sobrevida em animais ateroscleróticos.

# **Bibliografia**

A decorative flourish consisting of a central diamond shape with a stylized 'S' or 'G' inside, and two curved lines extending outwards from the top corners.

## 8. BIBLIOGRAFIA

ÅKERFELT M, MORIMOTO RI, SISTONEN L. **Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan.** *Nat Rev Mol Cell Biol.*, vol. 11, p.:545 – 555. 2010.

BASSÈRES, D. S.; BALDWIN, A. S. **Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression.** *Oncogene*, vol. 51, p.:6817 – 6830. 2006.

BATTERIDGE, D. **LDL heterogeneity: implications for atherogenicity in insulin resistance and NIDDM.** *Diabetology*, vol. 26, p.:3153 – 3159. 1997.

BERNARDIS LL, PATTERSON BD. **Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions.** *J Endocrinol*; vol. 40, p.:527 – 528. 1968.

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.*, vol. 72, p.:248 – 254. 1976.

BROCCHIERI, L.; CONWAY DE MACARIO, E.; MACARIO, A. J. **Hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions.** *BMC Evol Biol.*, vol. 8, p.:19. 2008.

BROWN, E. T.; UMINO, Y.; LOI, T.; SOLESSIO, E.; BARLOW, R. **Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice.** *Vis Neuroscience*, vol. 22, p.:615 – 618. 2005.

CALDER, P. C. **Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale.** *Biochimie.*, vol. 91, n. 1, p.: 791 – 795. 2009.

CALDER, P. C. **Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases.** *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 52, n. 1, p.:885 – 897, 2008a.

CALDER, P. C. Session 3: **Joint Nutrition Society and Irish Nutrition and Dietetic Institute Symposium on 'Nutrition and autoimmune disease' PUFA, inflammatory**

**processes and rheumatoid arthritis.** *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 67, n. 1, p.:409 – 418. 2008b.

CALDERWOOD, S. K.; XIAO, S. **The Inside Story: Anti-Inflammatory Roles of HSF1 and Heat Shock Proteins.** In: Asea, A. A. A; De Maio, A. *Heat Shock Proteins: Potent mediators of inflammation and Immunity*, vol. 1, cap. 7, Editora Springer, 2007.

CAMPENHOUT, V.; GOLLEDGE, J. **Osteocalcin positive mononuclear cells are associated with the severity of aortic calcification.** *Atherosclerosis*, vol. 210, p.:88 – 93. 2010.

CHEN, H. F.; XIE, L. D.; XU, C. S. **Role of heat shock protein 27 phosphorylation in migration of vascular smooth muscle cells.** *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 327, p.:1 – 6. 2009.

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.; HORVATH, 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.** *PNAS*, vol. 105, n.5, p.:1739 – 1744. 2008.

CURI, R, P. I. HOMEM DE BITTENCOURT. **Metabolismo do Ácido Araquidônico;** In: Da Silva , F. P. & Velasco, I.T. Sepse, Cap. 20, p. 214-242, *Editora Manole*, 1.ed., 2001.

D'AGOSTINO, R. B.; RAMACHANDRAN S. V.; MICHAEL, J. P.; PHILIP, A. W.; MARK, C.; MASSARO, J. M.; KANNEL, W. B. **General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care: The Framingham Heart Study.** *Journal of the American Heart Association*, vol. 117, n. 1, p.:743 – 753. 2007.

DALLINGA-THIE, G. M.; FRANSSEN, R.; MOOIJ, H. L.; VISSER, M. E.; HASSING, H. C.; PEELMAN, F.; KASTELEIN, J. J.; PÉTERFY, M.; NIEUWDORP, M. **The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight.** *Atherosclerosis*, vol. 1, p.:1 – 8. 2010.

DCGSC - Diretrizes sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular.** *Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq Bras Cardiol*, 2013.

DESSI, M.; NOCE, A.; BERTUCCI, P.; DI VILLAHERMOSA, S. M.; ZENOBI, R.; CASTAGNOLA, V.; ADDESSI, E.; DI DANIELE, N. **Atherosclerosis, dyslipidemia, and inflammation: the significant role of polyunsaturated fatty acids.** *ISRN Inflammation*, vol. 1, p.:1 – 14. 2013.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.** *Nature*, vol. 6809, p.:239 – 247. 2000.

FRANK, S.; KOSTNER, G. **Lipoprotein – Role in Health and Diseases.** *Ed. Intech.* 2012.

GAUTHIER, T. W.; SCALIA, R.; MUROHARA, T.; **Nitric oxide protects against leucocytes-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia.** *Atheroscler Thromb Vasc Biol.*, vol. 15, p.:1652 – 1659. 1995.

GEWIRTZ, A.T., NAVAS, T.A., LYONS, S., GODOWSKI, P.J., AND MADARA, J.L. **Cutting edge: Bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression.** *Journal Immunologic.*, vol. 167, n. 1, p.:1882 – 1885, 2001.

GILES, M. F.; ROTHWELL, P. M. **Measuring the Prevalence of Stroke.** *Neuroepidemiology*, vol. 30, p.:205 – 206. 2008.

GOLDIM, J.R. **Conferência de Asilomar.** [Acesso em julho 2012]. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/asilomar.htm>, 1997.

GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER Jr., J. R. **Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids.** *Methods Enzymol.*, vol. 268, p.:237 – 246. 1996.

HANSSON, G. K.; HERMANSSON, A. **The immune system in atherosclerosis.** *Nature Immunology*, vol. 12, p.:204 – 212. 2011.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada.** *Artmed*, 5º edição. 2012.

HELLINGS, W. E.; PEETERS, W.; MOLL, F. L.; PIERS, S. R.; VAN, S. J.; VAN DER SPEK, P. J. **Composition of carotid atherosclerotic plaque is associated with cardiovascular outcome: a prognostic study.** *Circulation*, vol. 121, p.:1941 – 1950. 2010.

HOMEM DE BITTENCOURT, P. I., Jr.; LAGRANHA, D. J.; MASLINKIEWICZ, A.; SENNA, S. M.; TAVARES, A. M. V.; BALDISSERA, L. P.; JANNER, D. R.; PERALTA, J. S.; BOCK, P. M.; GUTIERREZ, L. L. P.; SCOLA, G.; HECK, T. G.; KRAUSE, M.; CRUZ, L. A.; ABDALA, D. S. P.; LAGRANHA, C. J.; LIMA, T.; CURI, R. **LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions.** *Atherosclerosis Amsterdam*, vol. 193, n. 2, p.:245 – 258. 2007.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009.** [Acesso em 21 julho 2014]. Disponível em [http://www.ibge.gov.br/home/xml/pof\\_2008\\_2009.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/xml/pof_2008_2009.shtm).

IMAMURA, M.; BIRO, S.; KIHARA, T.; YOSHIFUKU, S.; TAKASAKI, K.; OTSUJI, Y.; MINAGOE, S.; TOYAMA, Y.; TEI, C. **Repeated thermal therapy improves impaired vascular endothelial function in patients with coronary risk factors.** *J Am Coll Cardiol.*, vol. 38, p.:1083 – 1088. 2001.

KNOWLTON, A. A. **NF- $\kappa$ B, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation cardiovascular.** *Cardiovascular Research*, v.69 , n.1 , p.:7 – 8, 2006.

LACCHINI & IRIGOYEN. **Estrutura e Função do Sistema Cardiovascular.** In *Margarida de Mello Aires*. Fisiologia, 4<sup>o</sup> edição. Rio de Janeiro – RJ, editora Guanabara koogan. 2012.

LAMARCHE, B.; TEHERNOF, A.; MOORJANI, S.; CANTIN, B.; DAGENAIS, G. R.; LUPIEN, P. J. **Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men.** *Circulation*, vol. 95, p.:69 – 75. 1997.

LEE, J. M.; CHOUDHURY, R. P. **Atherosclerosis regression and high-density lipoproteins.** *Expert Rev Cardiovasc Ther.*, vol. 9, p.:1325 – 1334. 2010.

LEE, S. A.; KIM, H. J.; CHANG, K. C. et. al. **DHA and EPA Down-regulate COX-2 Expression through Suppression of NF- $\kappa$ B Activity in LPS-treated Human Umbilical Vein Endothelial Cells.** *Korean Journal Physiology Pharmacology*, vol. 13, p.:301 – 307. 2009.

LIBBY, P. **Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease.** *Nutr Rev.*, vol. 65, p.:140 – 146. 2007.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, K. G. **Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis.** *Nature*, vol. 473, p.:317 – 325. 2011.

LUSIS, A. & PAJUKANTA, P. **A treasure trove for lipoprotein biology.** *Nature Genetics*, vol. 40, p.:1 – 2. 2008.

LUZ, P. L.; LAURINDO, F. R. **Inflamação e Aterosclerose.** In: *Nobre, F.; Serrano Júnior, C. V. Tratado de Cardiologia - Socesp.* Editora Manole, cap. 7, p.:369 – 380. 2005.

MADRIGAL-MATUTE, J.; MARTIN-VENTURA, J. L.; BLANCO-COLIO, L. M.; EGIDO, J.; MICHEL, J. B.; MEILHAC, O. **Heat-Shock Proteins In Cardiovascular Disease.** *Elsevier.* 2011.

MCNAMARA, J. R.; SMALL, D. M.; LI, Z. L.; SCHAEFER, E. J.; **Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformational changes in apolipoprotein.** *B. J.Lipid Res.*, vol. 37, p.:1924 – 1935. 1996.

MEYER, T. N. **Resposta celular ao estresse.** *Rev Ass Med Brasil*, vol.45, n.2, p.:181 – 188, 1999.

MONTECUCCO, F. & MACH, F. **Atherosclerosis is an inflammatory disease.** *Immunopathol.*, vol. 31, p.:1 – 3. 2009.

MORIMOTO, R., A. TISSIERES.; C. GEORGOPOULOS. **Stress Proteins in Biology and Medicine.** *New York: Cold Spring Harbor, Monograph Series* , 450 pg. 1990.

MORRELL, C. N. **Reactive oxygen species: Finding the right balance.** *Circ Res.*, vol. 6, p.:571 – 574. 2008.

NAPETSCHNIG, J.; WU, H. **Molecular basis of NF- $\kappa$ B signaling.** *Annu. Rev. Biophys*, vol. 42, p.:19.1 – 19.26. 2013.

O'DEA, E.; HOFFMANN, A. **NF- $\kappa$ B signaling.** *John Wiley & Sons, Inc.*, vol. 1, p.:107 – 115. 2009.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. **The NF- $\kappa$ B family of transcription factors and its regulation.** *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, vol. 1, p.:1 – 14. 2009.

OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M.; GHOSH, S. **Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways.** *Nature Immunology*, vol. 12, p.:695 – 708. 2011.

OKADA, M.; HASEBE, N.; AIZAWA, Y.; IZAWA, K.; KAWABE, J.; KIKUCHI, K. **Thermal treatment attenuates neointimal thickening with enhanced expression of heat-shock protein 72 and suppression of oxidative stress.** *Circulation*, vol. 14, p.:1763 – 1768. 2004.

OROSZ, A.; BENJAMIN, I. J. **Genetic models of HSF function.** In: *Stuart K. Calderwood, Protein Reviews, Volume 7: Cell Stress Proteins – Edited. Ed. Springer*, vol. 1, cap.5. 2007.

PACKARD, R. S. R.; LIBBY, P. **Inflammation in Atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction.** *Clinical Chemistry*, vol. 54, p.:24 – 38. 2008.

PIVA, R., G. BELARDO. **NF- $\kappa$ B: a stress-regulated switch for cell survival.** *Antioxid Redox Signal*, vol. 8, n. 34, p.:478 – 486. 2006.

POCKLEY, A. G.; SHEPHERD, J. **Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals.** *Immunol Invest*, vol. 27, n.1, p.: 367 – 377. 1998.

POCKLEY, A. G.; WU, R.; LEMNE, C.; KIESSLING, R.; FROSTEGARD, F. U. **Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease.** *Hypertension*, vol. 36, p.:303 – 307. 2000.

PRASSL, R.; LAGGNER, P. **Lipoprotein Structure and Dynamics: low density lipoprotein viewed as a highly dynamic and flexible nanoparticle.** In *Frank & Kostner - Lipoproteins – Role in Health and Diseases*. Ed. Intech, Cap. 1. 2012.

RAN, R., A. LU. **Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF- $\kappa$ B survival signaling.** *Genes Dev*, vol. 18, n. 12, p.:1466 – 1481. 2004.

ROBINSON, J. G.; FOX, K. M.; BULLANO, M. F.; GRANDY, S. **Atherosclerosis profile and incidence of cardiovascular events: a population-based survey.** *BMC Cardiovascular Disorders*, vol. 9, n. 46, p.:1 – 8, 2009.

ROSAMOND, W.; FLEGAL, K.; FURIE, K.; Go, A.; GREENLUND, K. **Heart Disease and Stroke Statistics- 2008 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee.** *Circulation*, vol. 117, n. 25, p.:146 – 155. 2008.

ROSSI, A.; KAPAHI, P.; NATOLI, G.; TAKAHASHI, T.; CHEN, Y.; KARIN, M.; SANTORO, M. G. **Antiinflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I $\kappa$ -B kinase.** *Nature*, vol. 403, p.:103 – 108, 2000.

ROSSI, A.; SANTORO, M. G. **Induction by prostaglandin A1 of haem oxygenase in myoblastic cells: an effect independent of expression of the 70 kDa heat shock protein.** *Biochem J.*, vol. 308, p.:455 – 463. 1995.

SAHA, J. K.; XIA, J.; GRONDIN, J. M.; ENGLE, S. K.; JAKUBOWSKI, J. A. **Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models.** *Exp Biol Med (Maywood)*, vol. 230, p.:777 – 784. 2005.

SCHELL, M. T.; SPITZER, A. L.; JOHNSON, J. A.; LEE, D.; HARRIS, H. W. **Heat shock inhibits NF- $\kappa$ B activation in a dose- and time-dependent manner.** *J Surg Res.*, vol. 129, p.:90 – 93. 2005.

SEMENKOVICHV, C. F. **Insulin resistance and atherosclerosis.** *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, p.:1813 – 1822. 2006.

SIMPSON, J. E.; NEWCOMBE, J.; CUZNER, M. L.; WOODROOFE, M. N. **Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions.** *J Neuroimmunol*, vol. 84, p.:238 – 249. 1998.

STARY, H. C.; CHANDLER, A. B.; GLAGOV, S.; GUYTON, JR.; INSULL, W. Jr.; ROSENFELD, M. E. **A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis in American heart Association.** *Circulation*, vol. 89, p.:2462 – 2478. 1994.

SUN, C.; ZHANG, F.; GE, X.; YAN, T.; CHEN, X.; SHI, X.; ZHAI, Q. **"SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B".** *Cell Metab.*, vol. 4, p.:307 – 319. 2007.

TABAS, I. **Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis.** *Nature Immunol.*, vol. 10, p.:36 – 46. 2010.

TAVARES, H.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. **Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR $\gamma$ ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica.** *Arq Bras Endocrinol Metabol.*, vol. 51, p.:526 – 533. 2007.

TOMKIN, G. H. **Atherosclerosis, diabetes and lipoproteins.** *Expert Rev Cardiovasc Ther.*, vol. 7, p.:1015 – 1029. 2010.

TOTH, P. P. **Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about it.** *Int. Journal Clin. Prac.*, vol. 62, p.:1246 – 1254, 2008.

VACHIER, I.; CHANEZ, P.; BONNANS, C.; GODARD, P.; BOUSQUET, J.; CHAVIS, C. **Endogenous anti-inflammatory compound.** *Journal Allergy Clinical Immunologic*, vol. 115, n. 1, p.:55 – 60, 2002.

VAN DER VELDE, A. E. **Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights.** *World J Gastroenterol*, vol. 47, p.:5908 – 5908. 2010.

VENTURINELLI, M. L.; HOVNAN, A.; SOEIRO, A. M.; NICOLAU, J. C.; RAMIRES, J. A. F.; D'AMICO, É. A.; SERRANO, C. V. Jr. **Ativação Plaquetária em Formas Clínicas Distintas da Doença Arterial Coronariana: Papel da P-Selectina e de outros Marcadores nas Anginas Estável e Instável.** *Arq. Bras. Cardiol.*, vol. 87, p.:446 – 450, 2006.

VOGIATZI, G.; TOUSOULIS, D.; STEFANADIS, C. **The role of oxidative stress in atherosclerosis.** *Hellenic J Cardiol.*, vol. 50, p.:402 – 409. 2009.

XU, Q.; SCHETT, G.; PERSCHINKA, H.; MAYR, M.; EGGER, E.; OBERHOLLENZER, F. **Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population.** *Circulation*, vol. 102, p.:14 – 20. 2000.

YOO, C.; LEE, S.; LEE, C.; KIM, Y. W.; HAN, S. K.; SHIM, Y. **Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I $\kappa$ B $\alpha$  through preventing I $\kappa$ B kinase activation in respiratory epithelial cells.** *Journal of Immunology*, vol. 164, p.:5416 – 5423. 2000.