

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Influência da fase do ciclo estral na expressão de HSP70 induzida por desafio térmico em células de sangue periférico de camundongas C57BL/6J – Um estudo piloto

MARCELA ALVES DE AZEVEDO

PORTO ALEGRE, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Influência da fase do ciclo estral na expressão de HSP70 induzida por desafio térmico em células de sangue periférico de camundongas C57BL/6J – Um estudo piloto

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior
Coorientadora: Me. Helena Trevisan Schroeder

PORTO ALEGRE, 2021

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço primeiramente a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, instituição pública e de qualidade, que apesar de desmontes sofridos pelo desgoverno atual, segue com a excelência de ser uma das melhores Universidades da América Latina. Agradeço também a Faculdade de Farmácia e aos professores que tive a oportunidade de conhecer e aprender, por serem profissionais renomados e capazes de formar profissionais extremamente competentes. Por onde eu for, falo com orgulho que sou filha da UFRGS e que tive o privilégio de aprender com os melhores. Quero agradecer também a todos os profissionais com quem eu convivi nos estágios, na Farmácia Distrital Farroupilha e no LAC do HNSC, por fazerem parte do meu crescimento e me mostrarem a vida real do farmacêutico.

Agradeço ao meu professor orientador, Paulo Ivo, que abriu as portas do laboratório pra mim lá em 2016, que acreditou em mim (mesmo eu tendo só um rosto ‘fofinho’) e me deu a oportunidade de ver de perto o profissional dedicado e a pessoa maravilhosa que ele é. Gordo, muito obrigada por me ensinar tanto e por ter acreditado na minha capacidade, me dando força pra crer que eu não sou uma nulidade (nem na vida, nem nas palavras cruzadas).

Agradeço a minha coorientadora, Helena, por ter me pego pela mão e caminhado comigo, desde meu primeiro dia no lab, quando nós duas éramos as pimpolhas do profe. Por me ensinar tudo que eu sei, por ser minha mentora pimpolha chefe, me fazer crescer como profissional e por, principalmente, não ter desistido de mim; mesmo quando só o que eu fazia era explodir falcons no micro-ondas e estressar os camundongos. Também tenho que agradecer a ti, Heleninha, agora como minha amiga. Muito obrigada por ser minha duplinha e por gostar de mim, mesmo eu só te dando dor de cabeça.

Agradeço a Inesinha e ao Seu Carlos por fazerem parte dessa jornada, por todas as palavras cruzadas, cucas (por favor, Dona Inês, não caia na João Pessoa de novo. Grata.) e por todos os momentos maravilhosos. Por serem pessoas que eu quero levar pra vida toda, fazer vários churrascos e noites do Uno.

Agradeço a todo o FisCel por tudo. Todos os ensinamentos e companheirismo durante esses 5 anos de IC. Maurício, Jorge, Cinthia, Victinho, Gisele, Rossana, Sofia, Everton e Ritinha.

Agradeço aos meus pais, Jeanine e Marco, por me apoiarem do início ao fim. Por estarem presente em todos os momentos. Por serem minha base e meu porto seguro. Se eu cheguei até aqui, vocês são os responsáveis por isso, por mais que, às vezes, eu seja teimosa e não admita. Agradeço a Baydey, por ser minha fã número 1 (não fica com ciúmes, mãe), por sempre rezar por mim, por dizer que eu estou no caminho certo e que tem orgulho de mim. Agradeço ao Irmão que fez o favor de puxar todos os genes de altura pra si e me deixar com a sobra, que apesar da distância, é e vai sempre ser meu exemplo. Agradeço a toda a minha família por entender a minha ausência em vários momentos e por torcer por mim sempre, Pica-Pau, tio Peludo, Mari, Duda, Carol, Dinda, Dindo, Maninho e Mitinho. Eu amo vocês infinito!

Agradeço ao meu namorado João, meu moço, que estava comigo desde quando vi meu nome no listão e que está aqui comigo, do meu lado, no nosso apartamento, enquanto estou escrevendo. Muito obrigada por ser meu parceiro, meu amor, por ser meu abraço em dias de luta e em dias de glória. Eu te amo muito, pra sempre. Faço também uma menção honrosa a Titi, que é nossa companheirinha do bafinho fedorento que eu amo demais.

Agradeço as minhas migas, minhas Pincesas e minhas Flores: Carol, Dani, Eliane Regina, Karininha, Ket, Pauxielen e Rê, por passarmos juntas por todos esses anos de FacFar, que a gente sabe que foram sofridos, suados, cheios de noites sem dormir e com muito choro. Se eu terminei essa bagaça, quero que vocês saibam que foi porque vocês estiveram comigo. Que foi o carinho, o abraço, os almoços no RU, as viagens de ônibus, as noites juntas estudando pra provas. Por trás de toda mulher forte, existe outra mulher forte ajudando-a nos dias mais difíceis. E foram vocês. Muito obrigada.

Agradeço a eles que merecem um parágrafo só pra eles. Marcella, Gustavo e Mell. Muito obrigada, por estarem comigo, por chorarem e sorrirem comigo, por torcerem pela minha vitória como se fosse a de vocês, e por estarem aqui, sempre. Assim como eu sempre vou estar aqui pra vocês. Amo vocês, muito obrigada por tudo.

Por último, agradeço a uma pessoinha que foi forte, que não desistiu, que caiu, levantou de cabeça erguida e seguiu o baile. Uma pessoinha que não acreditou que era possível, mas que ainda assim, foi lá e fez. E essa pessoinha sou eu 😊.(minha psicóloga pira nessa autodeclaração, valeu Zildinha).

RESUMO

O ciclo estral de camundongos fêmeas, composto por proestro, estro, metaestro e diestro, deve ser entendido e distinguido a fim de se observar possíveis diferenças em diversos mecanismos fisiológicos, devido a variação hormonal e citologia característica de cada fase do ciclo. A proteção do hormônio estrogênio às fêmeas, em relação a doenças metabólicas, está relacionada à capacidade deste induzir a via de choque térmico (HSR), cuja principal função é produzir HSP70, chaperona intracelular que tem papel anti-inflamatório e citoprotetor, auxiliando na resolução da inflamação sistêmica do organismo em situações de estresse celular associadas a inflamações crônicas de baixo grau. Tendo em vista a necessidade crescente de se ampliar o conhecimento do uso de fêmeas nos nossos modelos de investigação, o presente estudo piloto tem como objetivos avaliar as fases do ciclo estral de camundongos fêmeas e se existe relação com a HSR e a produção de HSP70. Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6J com três meses de vida nas diferentes fases do ciclo estral, determinadas através da citologia dos lavados vaginais. O sangue coletado foi heparinizado, disperso em meio de cultura e o desafio térmico *ex vivo* foi realizado por 2 h a 42 °C (ou controle a 37 °C) com posterior 6 h de recuperação a 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂ em ar. As amostras foram preparadas para Western Blot por eletroforese SDS-PAGE, imunodeteção de proteínas HSP70 e Vinculina como normalizador. A imunodeteção foi realizada por quimiluminescência com uso de kit ECL e exposição ao filme fotográfico. Como resultados, observamos um efeito significativo da fase do ciclo estral na imunodeteção de HSP70 ($p = 0,0455$), mas não foi possível identificar em qual grupo essa tendência se encontrava. Conclui-se então que, de acordo com o nosso n amostral, a fase estral de camundongos fêmeas parece ter influência na expressão de HSP70, sendo necessários mais estudos para corroborar esse achado.

PALAVRAS-CHAVE: HSP70; desafio térmico; HSR; fêmeas

ABSTRACT

The estrous cycle of female mice, composed of proestrus, estrus, metestrus and diestrus, must be understood and distinguished in order to observe possible differences in several physiological mechanisms, due to the hormonal variation and cytology characteristic of each phase of the cycle. The protection of the estrogen hormone to females, in relation to metabolic diseases, is related to its capacity of inducing the heat shock response (HSR), whose main function is to produce HSP70, an intracellular chaperone that has an anti-inflammatory and cytoprotective action, helping in the resolution of systemic inflammation of the organism in situations of cellular stress associated with low-grade chronic inflammation. In view of the growing need to expand the knowledge of the use of females in our models of investigation, the present pilot study aims to evaluate the stages of the estrous cycle of female mice and whether there is a relationship with HSR and the production of HSP70. Female C57BL / 6J mice with three months of life were used in the different phases of the estrous cycle that were determined through cytology of vaginal lavages. The blood collected was heparinized, dispersed in culture medium and the *ex vivo* thermal challenge was carried out for 2 h at 42 ° C (or control at 37 ° C) with a subsequent 6 h of recovery at 37 ° C with 5% CO₂ in air. The samples were prepared for Western Blot by SDS-PAGE electrophoresis, immunodetection of HSP70 proteins and Vinculin as a normalizer, and immunodetection was performed by chemiluminescence using an ECL kit and exposure to the photographic film. As a result, we observed a significant effect of the estrous cycle phase on the immunodetection of HSP70 ($p = 0.0455$), but it was not possible to identify in which group this tendency was found. It is concluded that, according to our sample, the estrous phase of female mice seems to have an influence on the expression of HSP70, and further studies are needed to corroborate this finding.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fases do ciclo estral e seus principais hormônios	11
Figura 2: Via de choque térmico e sua relação com estrogênio	14
Figura 3: Animais em ambiente enriquecido	17
Figura 4: Placas de 24 poços com sangue e meio de cultura RPMI 1640 pipetados	18
Figura 5: Placa com sangue e meio RPMI 1640 durante desafio térmico em banho-maria a 42 °C	19
Figura 6: Imagens representativas dos lavados vaginais de camundongos fêmeos	22
Figura 7: Imunodeteção de HSP70	23

LISTA DE ABREVIATURAS

DMT2 – *Diabetes mellitus* tipo 2

HSR – do inglês, *Heat Shock Response*

HSP70 – do inglês, *Heat Shock Protein* da família de 70 kDa

HuR - Fator de estabilização de RNA mensageiro Antígeno Humano R

HSF1 – do inglês, *Heat Shock Factor 1*

SIRT1 – enzima Sirtuina 1

NO – Óxido Nítrico

UPR – do inglês, *Unfolded Protein Response*

NF- κ B - Fator Nuclear kappa B

PE - Proestro

ES - Estro

ME - Metaestro

DE – Diestro

ER α – Receptor nuclear de estrogênio periférico

ERm – Receptor de membrana de estrogênio periférico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Local de Realização	17
3.2 Animais	17
3.3 Determinação das fases do ciclo estral	17
3.4 Coleta de sangue	18
3.5 Desafio térmico	18
3.6 Preparação das amostras	19
3.7 Western Blot	19
3.8 Análise estatística	21
3.9 Aspéctos éticos	21
4. RESULTADOS	22
4.1 Avaliação citológica do lavado vaginal	22
4.2 Imunodeteccção de HSP70	23
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO

Para o avanço na qualidade da pesquisa básica, tem-se discutido padrões e ferramentas para que estudos realizados em modelos animais possam ser translacionados para o objetivo final: a clínica. Entre essas discussões temos cada vez mais claro a necessidade do estudo diferencial entre as características e respostas apresentadas entre machos e fêmeas (GRANT *et al.*, 2019; CHABRUN *et al.*, 2020). Entretanto, muitas vezes, pouco se sabe das próprias características fisiológicas dos modelos utilizados, especificamente nas fêmeas (KARP *et al.*, 2017). Cada vez mais os pesquisadores têm sido encorajados a expandir seus estudos contemplando o dimorfismo sexual e aumentando a utilização de fêmeas em modelos classicamente estudados somente em machos (CLAYTON; COLLINS, 2014). E, para tanto, precisamos entender mais acerca dos mecanismos fisiológicos dos nossos modelos fêmeos, atentos às características específicas da maturidade e fase do ciclo estral.

O ciclo estral de camundongos fêmeos da linhagem C57BL/6J é considerado regular e dura em torno de cinco a seis dias (SCHUSTER; SCHAUB, 2001). Sendo composto por quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro. O proestro é onde ocorre a aceleração do crescimento dos folículos, que começam a secretar estrogênio. No estro ocorre a ovulação, sendo a fase de cio da fêmea. O metaestro é quando se inicia o funcionamento dos corpos lúteos e há queda nos níveis de estrogênio. O diestro é a fase luteínica ativa, com picos de concentração de progesterona e, caso a fêmea engravide, a fase diestro se prolonga durante a gravidez. Quando as fêmeas se encontram na mesma caixa, ocorre uma sincronidade, desta forma todas apresentam a mesma fase do ciclo, ao mesmo tempo (BANKS, 1992, p. 626).

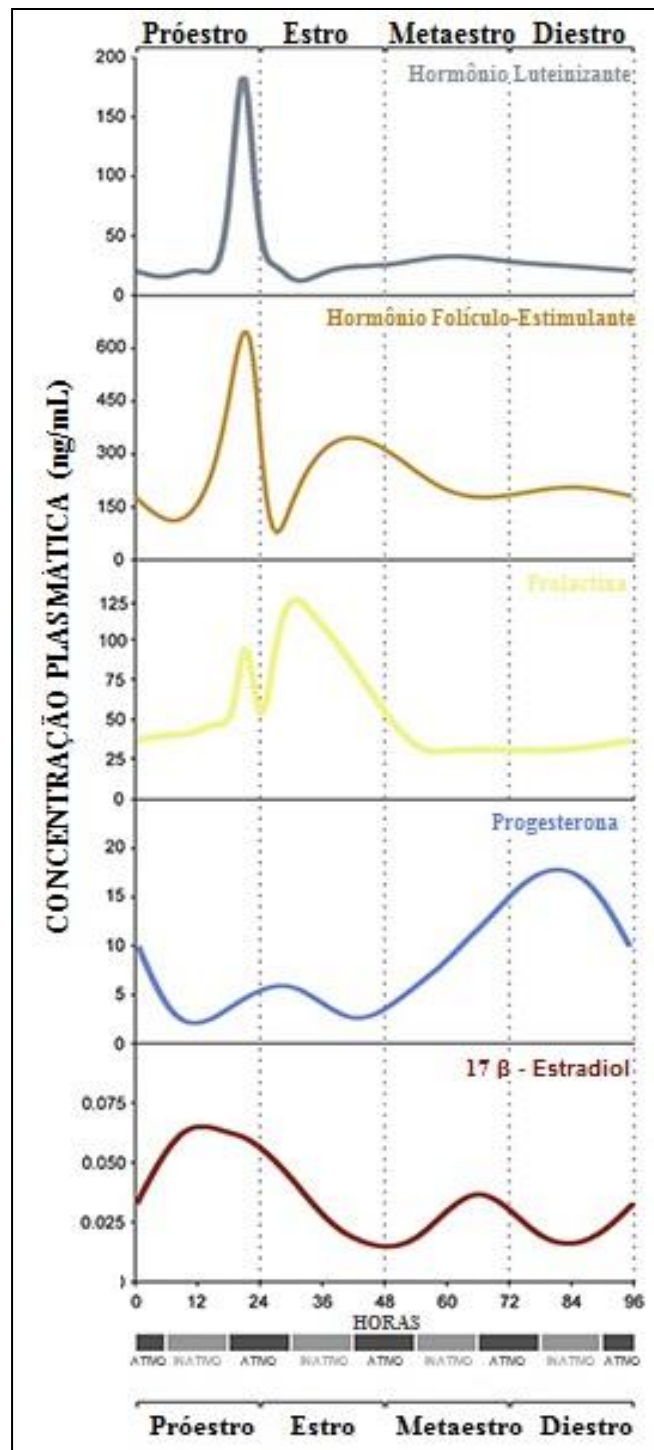


Figura 1: Fases do ciclo estral e seus principais hormônios (adaptado de MCLEAN *et al.*, 2012).

É possível distinguir em qual fase do ciclo as fêmeas se encontram através de lavados e esfregaços citológicos, pois cada fase do ciclo estral é caracterizada por uma alteração morfológica distinta. Em lavados vaginais de camundongos fêmeos, as células predominantes permitem a definição de cada fase do ciclo. Quando em próestro, ocorre o predomínio de aglomerado de células epiteliais superficiais com núcleo arredondado.

No estro, estão presentes células epiteliais escamosas cornificadas em aglomerado. As fases metaestro e diestro são fases citologicamente semelhantes, pois em ambas é observada a presença abundante de pequenos leucócitos, porém o metaestro é caracterizado pela presença de células epiteliais superficiais em aglomerados ou não, e na fase diestro, é vista a presença de células epiteliais escamosas cornificadas fragmentadas (MCLEAN *et al.*, 2012).

Conforme observado na **Figura 1**, a secreção do hormônio estrogênio atinge o seu pico plasmático na fase proestro, e vai diminuindo na fase estro até o início da fase metaestro, onde volta a subir levemente, e decai novamente quando se inicia a fase diestro (MCLEAN *et al.*, 2012). O estrogênio possui um caráter protetivo às fêmeas, em camundongos e humanas, sobre doenças metabólicas, como *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2) e obesidade (THURSTON; JOFFE, 2011; THURSTON *et al.*, 2012; VAN DIJK *et al.*, 2015; RYU *et al.*, 2015). Inclusive, parece existir uma relação sobre a suscetibilidade metabólica do organismo ao início de fogachos, no climatério (na pré-menopausa), quando as mulheres apresentam maiores riscos de desenvolver doenças metabólicas relacionadas a inflamação crônica de baixo grau, devido a perda de proteção do estrogênio (MIRAGEM; HOMEM DE BITTENCOURT, 2017), sendo esse um hormônio importante e estimulador da via de choque térmico (HSR, do inglês, *heat shock response*).

A obesidade e o DMT2 são doenças metabólicas de natureza inflamatória e estão cada vez mais incidentes na população em geral. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a prevalência mundial de obesidade quase triplicou entre 1975 a 2016 (WHO, 2020). Em 2016, estima-se que 422 milhões de pessoas no mundo tinham diabetes, sendo que atribui-se a essa doença cerca de 1,6 milhão de mortes por ano (WHO, 2020). Essas doenças crônico-degenerativas associadas à inflamação crônica de baixo grau são situações de estresse homeostático que têm em comum uma resposta de choque térmico (HSR) suprimida e ineficiente (NEWSHOLME; HOMEM DE BITTENCOURT, 2016) que, aliada a resistência à insulina presente nessas condições patológicas, impede que haja a resolução fisiológica da inflamação, dessa forma sendo perpetuada e contribuindo para o estresse sistêmico do organismo (NEWSHOLME; DE BITTENCOURT, 2014; RIUS *et al.*, 2012). Parece que nas fêmeas (e mulheres) esta relação tem grande importância, já que a manutenção da HSR está intimamente ligada aos mecanismos

neuroprotetivos necessários no climatério (MIRAGEM; HOMEM DE BITTENCOURT, 2017).

Humanos e animais apresentam a HSR que é centrada na indução da expressão de *chaperonas* da família das proteínas de choque térmico, como a representante de 70 kDa (HSP70, do inglês: *heat shock protein*). A HSP70 é a proteína de choque térmico mais abundante encontrada no organismo (SINGH; HASDAY, 2013) e possui um alto grau de conservação ao longo da evolução, chegando a ter uma homologia de 50 % entre a proteína encontrada na bactéria *Escherichia coli* e a do ser humano (DAUGAARD; ROHDE; JAATTELA, 2007). No meio intracelular, tem função citoprotetora e anti-inflamatória (CALDERWOOD; XIAO, 2007). Essa resposta é necessária para a manutenção da homeostase celular e visa a encerrar o quadro inflamatório e resolver as lesões teciduais. Conforme mostrado na **Figura 2**, a via de choque térmico é composta pelo fator de estabilização de RNA mensageiro Antígeno Humano R (HuR, também conhecido como ENLAV) ou HuR, a enzima sirtuina 1 (SIRT1), o fator de transcrição da família de choque térmico (HSF1, do inglês: *heat shock factor 1*) e a própria HSP70 (SINGH; HASDAY, 2013). A HSR é modulada por diversos fatores metabólicos, como o estado alimentar (FEBBRAIO *et al.*, 2004), estresse oxidativo (MORIMOTO; TISIERES; GEORGOPOULOS, 1990), produção de óxido nítrico (NO) (KRAUSE *et al.*, 2015) e sua ativação faz parte da resposta a proteínas desdobradas (UPR, do inglês *unfolded protein response*) (BIDEN *et al.*, 2014). A ativação desta via é observada em tecidos, como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, além de células imunológicas encontradas no sangue periférico (CRUZAT *et al.*, 2014; LEITE *et al.*, 2016; PETRY *et al.*, 2015; PETRY *et al.*, 2014) e sua principal função é bloquear a perpetuação das vias inflamatórias ativas, realizando o bloqueio direto da ativação e translocação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (YOO *et al.*, 2000). O estrogênio, já mencionado anteriormente, possui capacidade de induzir a expressão de HSP70, via estimulação direta do HSF1 e aumento da produção de NO (OLAZÁBAL; PFAFF; MOBBS, 1992; KNOWLTON; SUN, 2001; HAMILTON; GUPTA; KNOWLTON, 2004; STICE *et al.*, 2011).

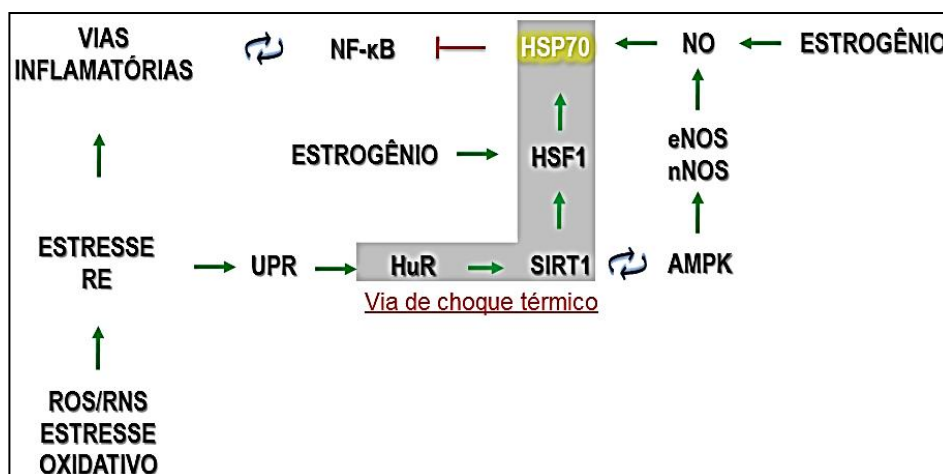


Figura 2: Via de choque térmico e sua relação com estrogênio

É possível realizar a medida da capacidade da HSR, pela exposição das células, por um determinado tempo, a situações de estresse agudo, que tem como principais exemplos o exercício físico e o calor, e quantificação da expressão da HSP70 obtida após o estresse induzido artificialmente, quando comparado ao seu controle mantido por igual tempo a 37 °C. Trataremos essa medida da capacidade da HSR como “desafio térmico”, cujo protocolo *in vitro* é diferente de acordo com cada grupo de pesquisa (DE LEMOS MULLER *et al.*, 2019). Os protocolos utilizados diferem na temperatura e tempos utilizados, de acordo com objetivos dos trabalhos e os tipos celulares utilizados.

Em nosso laboratório, testamos, primeiramente, qual seria o protocolo ideal de desafio térmico que atendesse os nossos objetivos de obter o máximo aumento de expressão de HSP70 produzida pelas células do sangue periférico. Tendo em vista que propomos a aplicação desta técnica minimamente invasiva para os estudos utilizando modelos animais, tornando-os translacionais e possibilitando a correlação entre os achados nos tecido metabólicos (*e.g.*, fígado, tecido adiposo, músculos) desses modelos e a evolução das doenças inflamatórias em humanos. Para isso, utilizamos dois protocolos com tempos de incubação diferente (1 h ou 2 h) e com troca de meio de cultura, ou não (SCHROEDER, 2020). A partir desse estudo, constatamos que o melhor protocolo, e que será seguido neste trabalho, é quando realizada a incubação de 2 h a 42 °C sem a troca de meio de cultura durante o processo. Em paralelo a essa padronização de desafio térmico, também foi questionado se existiria algum diferencial na expressão de HSP70 entre camundongos machos e fêmeos, e constatou-se que ambos não apresentam diferenças na expressão de HSP70, quando seguido o mesmo protocolo (SCHROEDER, 2020). Para explorar a possibilidade do desafio térmico como uma

ferramenta menos invasiva de medir em humanos a HSR e estudar esse comportamento em fêmeas tendo em vista a influência, já citada, do estrogênio na ativação da HSR, nos questionamos se, entre camundongos fêmeos, ocorreria diferença na expressão de HSP70 dependendo da fase do ciclo estral que estivessem, dando origem ao objetivo exploratório do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a existência da relação entre a HSR e a fase do ciclo estral de camundongos fêmeos.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar qual fase do ciclo estral é a ideal para realizar o desafio térmico.
- Observar a resposta de HSP70 em leucócitos circulantes submetidos ao desafio térmico a 42 °C (ou controle a 37 °C).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de Realização

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 (Rua Sarmiento Leite n° 500, 2° andar, CEP 90050-170 Porto Alegre, RS).

3.2 Animais

Para este estudo, foram utilizados 16 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J, com três meses de vida em diferentes fases do ciclo estral. Os animais foram obtidos do Biotério Setorial de Camundongos do Departamento de Fisiologia, ICBS – UFRGS e mantido pelo Laboratório de Fisiologia Celular (FisCel) de janeiro a março de 2020 com livre acesso a água e ração durante todo o período do experimento, com ciclo claro (luz artificial) /escuro de 12 h estabelecido pelo biotério (*timer*), com temperatura ambiente constante a 25 ± 1 °C. Os animais foram acomodados em caixas de polipropileno (18 x 34 x 41 cm) com maravalha de madeira, com ambiente enriquecido e de 3 a 4 animais em cada caixa. Os camundongos foram randomizados em 4 grupos (n = 4): proestro (PE), estro (ES), metaestro (ME) e diestro (DE), referentes as fases do ciclo estral determinadas conforme a metodologia descrita abaixo.



Figura 3: Animais em ambiente enriquecido.

3.3 Determinação das fases do ciclo estral

A determinação das fases do ciclo estral dos camundongos fêmeas foi feita com a avaliação citológica do lavado vaginal (MCLEAN *et al.*, 2012). Os lavados foram

colhidos com o auxílio de uma ponteira contendo aproximadamente 100 μ L de água bidestilada estéril. Foi expelido $\frac{1}{4}$ do volume dessa solução na abertura do canal vaginal, coletado novamente e esse processo foi repetido de 4-5 vezes para obter um número de células suficiente para permitir análise citológica. O lavado extraído foi colocado em uma lâmina de vidro e o esfregaço foi seco naturalmente à temperatura ambiente. Após a secagem, os esfregaços foram corados com corante Violeta Cristal 0,1 % e fixados com glicerol 15 % e lamínula. As lâminas contendo os esfregaços corados foram imediatamente analisadas em Microscópio Invertido Olympus IX81 sob o aumento de 400X e microfotografias foram tiradas no momento da análise para documentar a citologia observada.

3.4 Coleta de sangue

Os animais ficaram 10 h em jejum e, após a identificação da sua fase do ciclo estral, a coleta do sangue foi realizada imediatamente após a sua eutanásia por guilhotina. Nenhum anestésico foi utilizado, pois a glicemia do animal sofreria alteração com a sua administração (BROWN *et al.*, 2005). O sangue heparinizado foi disperso em meio de cultura, RPMI 1640 (1:10 v/v) suplementado com penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL), com pH 7,4, tamponado com bicarbonato a 2 % m/v, previamente aquecido a 37 °C em placas de 24 poços devidamente vedadas.



Figura 4: Placas de 24 poços com sangue e meio de cultura RPMI 1640 pipetados.

3.5 Desafio térmico

O desafio térmico *ex vivo* foi realizado com incubação das placas com sangue e meio de cultura em banho-maria. A placa, cuja via de choque térmico seria estimulada, permaneceu por 2 h em banho-maria a 42 °C, enquanto seu controle ficou em outro banho-maria a 37 °C. Decorridas as 2 h do protocolo de desafio térmico, as placas foram

incubadas em estufa com atmosfera a 5 % de CO₂ a 37 °C por 6 h adicionais para observar-se o aumento da HSP70, como resultado final da estimulação da via de choque térmico.

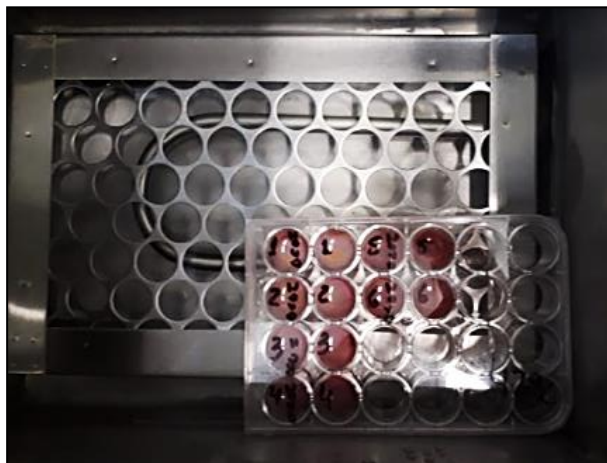


Figura 5: Placa com sangue e meio RPMI 1640 durante desafio térmico em banho-maria a 42 °C.

3.6 Preparação das amostras

Após o protocolo de desafio térmico ter sido realizado, as amostras foram centrifugadas, tratadas com tampão de hemólise e ressuspensas em tampão de lise RIPA Buffer (SIGMA ALDRICH, R0278) adicionado de um coquetel de inibidores de protease (fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 100 µM, N-tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK) 20 µM, aprotinina 2 µg/mL e leupeptina 2 µg/mL) e fosfatase (ortovanadato de sódio 1 mM, molibdato de sódio 1 mM, β-glicerofosfato 1 mM), e colocadas a 30 s em vórtex. As amostras foram congeladas e mantidas a – 20 °C até o momento de preparo para Western Blot por eletroforese SDS-PAGE e imunodeteccção de proteínas HSP70.

3.7 Western Blot

As análises das amostras foram realizadas entre fevereiro e março de 2021. Após descongeladas, em isopor com gelo, as amostras foram rompidas em homogeneizador ultrassônico de ponteira, 0,5 ciclos de 30 s a 70 % de amplitude, ainda em gelo. Após esse processo, os homogeneizados foram centrifugados a 16.000 x g por 1 min à temperatura ambiente e os sobrenadantes foram coletados. A concentração de proteína foi determinada com a amostra diluída com água milli-Q

(1:10, v/v), utilizando-se o espectro UV a 280 nm em Nanovue. Depois de realizar-se a dosagem de proteínas, as amostras foram diluídas com SDS a 0,1 % (m/v) em Sample Buffer contendo 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, e fervidas por 5 min para desnaturação completa.

Quantidades equivalentes de proteína (aproximadamente 35 µg por poço do gel) foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10 % para separação durante 2 h utilizando-se corrente elétrica constante a 100 V. O sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-ProteanTetraCell (BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA, USA) foi preenchido com tampão de corrida contendo Tris a 25 mM e SDS a 1 % (m/v), pH 8,3. O marcador de peso molecular foi uma mistura de proteínas recombinantes previamente coloridas (RPN800E, GE Health Care), sendo 5 µL adicionados por gel. Para realizar a eletrotransferência, foi feita a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (GE Health Care-Amersham) utilizando o sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100 V constantes por 2 h. Para confirmar a transferência efetiva das proteínas, coramos as membranas de nitrocelulose com Vermelho Ponceau S (Red Ponceau S, sal de sódio 0,3 %, Sigma, em solução de ácido tricloroacético a 3 %), sendo, em seguida, descoradas com solução TEN (Tris-EDTA-NaCl a respectivamente 50, 5 e 150 mM)-Tween 0,1 % (v/v).

Para determinar a expressão de HSP70 foi utilizado anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147) (1:1000 v/v) que reconhece tanto a forma induzível de 72 kDa quanto a forma constitutiva de 73 kDa, sendo incubado *overnight* sob agitação constante a 4 °C. Como segundo anticorpo, anti-IgG de camundongo (1:50000, v/v) foi utilizado um conjugado com biotina (Sigma SAB3701216) incubado por 1 h à temperatura ambiente com agitação, com posterior incubação por 1 h também à temperatura ambiente com agitação com estreptavidina (1:1000, v/v) (Sigma S6390).

A imunodeteccção foi realizada por quimiluminescência com uso de kit ECL (Thermo Scientific). A membrana de nitrocelulose foi incubada com essa reação química do kit, em torno de 10 segundos, e foi exposta ao filme fotográfico (Amersham HyperfilmTM) por 5 min. Depois da exposição, o filme foi revelado com reagente revelador (Kodak Dektol) por 3 min e fixado com reagente fixador (Kodak Professional) por 30 s. Após a fixação, os filmes foram lavados com água e digitalizados para posterior quantificação no programa Image J 1.51f.

3.8 Análise estatística e cálculo do tamanho amostral

O tamanho amostral para este estudo piloto foi calculado para detectar a menor diferença esperada entre os grupos a partir da padronização da técnica em nosso laboratório (Schroeder, 2020). Utilizando-se para o cálculo um poder estatístico de 80 % para um nível de significância de $p < 0,05$ utilizou-se a calculadora online produzida pelo Prof. José Roberto Pereira Lauris e disponível em:

><http://calculoamostral.bauru.usp.br/calculoamostral/index.php><. O número de animais utilizados para a execução do projeto foi o mínimo indispensável para produzir o resultado, poupando-se, ao máximo, os animais de sofrimento.

Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e foram considerados não-paramétricos. Os dados foram tratados, realizando transformação para logaritmo em base dez, para apresentarem distribuição normal e seguiu-se com as análises teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias e teste *post hoc* de Tukey. Para os resultados de imunodeteccção de HSP70, o programa estatístico utilizado para as análises foi GraphPad Prism versão 8.0.

3.9 Aspectos éticos

Os procedimentos realizados neste estudo estavam de acordo com a Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca), 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. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA, e encontra-se protocolado sob nº 37881 na Base de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os descartes de resíduos biológicos e químicos foram realizados corretamente, conforme preconizado pela UFRGS.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação Citológica do Lavado Vaginal

Para a confirmação da fase estral apresentada por cada camundongo fêmeo com três meses de vida, no momento da eutanásia, foi realizada a caracterização das células presentes no esfregaço do lavado vaginal, e os animais foram separados conforme fase estral, demonstrado na **Figura 6**.

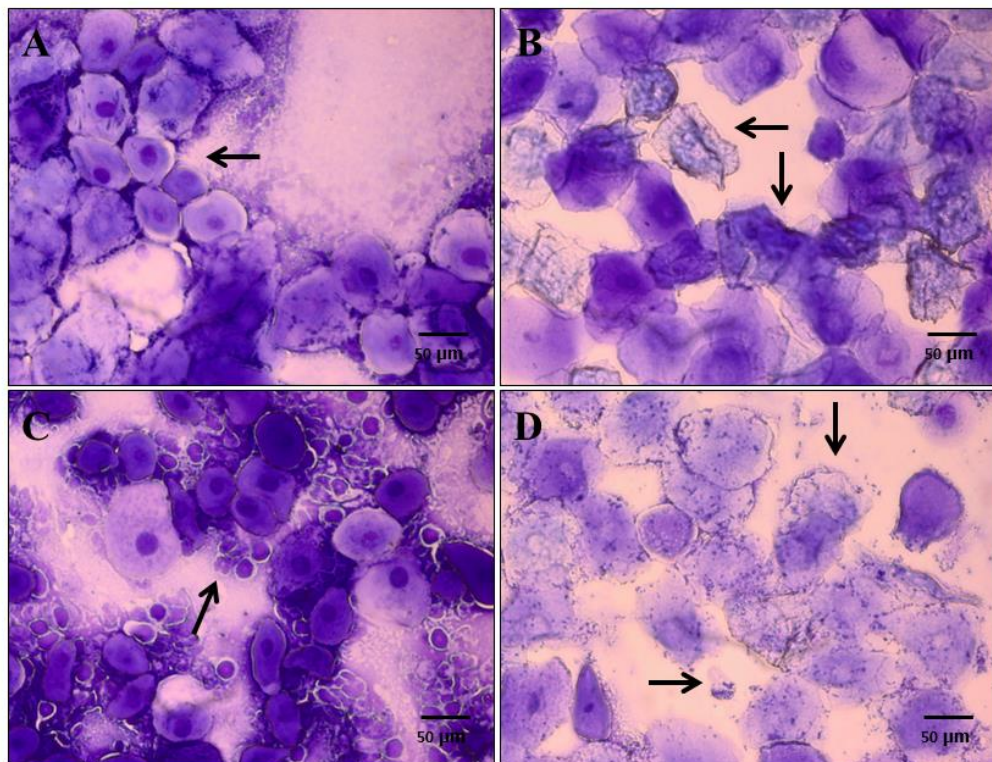


Figura 6: Imagens representativas dos lavados vaginais de camundongos fêmeos. A: fase proestro (células epiteliais em aglomerado). B: fase estro (células epiteliais escamosas cornificadas em aglomerado). C: fase metaestro (predomínio de leucócitos). D: fase diestro (células epiteliais escamosas cornificadas e leucócitos).

4.2 Imunodeteção de HSP70

Para a visualização dos resultados de imunodeteção de HSP70 feita por quimiluminescência por kit ECL, fixação, digitalização e quantificação, o gráfico com as unidades arbitrárias de HSP70 em seus respectivos grupos e temperaturas testadas está mostrado abaixo, na **Figura 7**. Como resultado, não foi observada diferença significativa na expressão de HSP70 entre os grupos após o protocolo de desafio térmico de incubação por 2 h a 42 °C em relação ao grupo controle de 37 °C, mas foi

possível observar um efeito significativo da fase do ciclo estral nos resultados observados ($p = 0,0455$), nos indicando que deve haver alguma relação das fases do ciclo estral com a HSR, que o *post hoc* Tuckey do nosso estudo não apresentou poder estatístico suficiente para localizar entre quais grupos do ciclo estral reside a diferença.

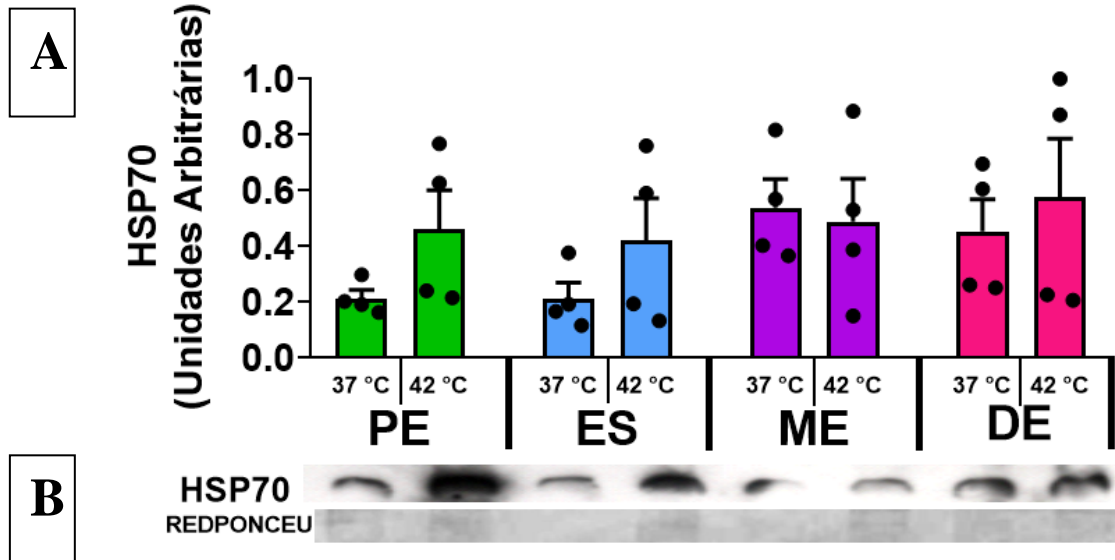


Figura 7: Imunodetecção de HSP70 em células do sangue periférico submetidas a desafio térmico por 2h a 42 °C comparadas ao seu controle a 37 °C extraídas de camundongos fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. PE: próestro; ES: estro; ME: metaestro; DE: diestro. Efeito significativo da fase do ciclo estral nos resultados observados com $p = 0,0455$. A- Gráfico de barras com apresentação dos dados individuais (círculos pretos), resultados expressos em média \pm erro padrão da média. B – Imagem representativa da imunodetecção.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou as fases do ciclo estral em que se encontravam os camundongos fêmeos utilizados no estudo, por meio da citologia dos lavados vaginais, e investigou a existência da relação destes com a HSR visando a padronização da fase ideal para realização do protocolo de desafio térmico. Para isso, realizamos a imunodeteção de HSP70 em leucócitos circulantes como resposta ao estímulo de 2 h a 42 °C, comparado com o seu controle a 37 °C.

A citologia dos lavados vaginais é a técnica mais indicada para confirmar a fase estral (BYERS *et al.*, 2012) e propiciou uma avaliação precisa das fases do ciclo estral de cada fêmea, de forma que nossos resultados foram coerentes com a literatura (BYERS *et al.*, 2012; CALIGIONI, 2009). Complementar a isso, existem outros métodos que também poderiam ter sido utilizados para verificar a fase estral e que complementaríamos os nossos achados, como: a avaliação visual da genitália externa das camundongas (CHAMPLIN; DORR; GATES, 1973) e a análise da bioquímica urinária das camundongas (ACHIRAMAN *et al.*, 2011). Sendo interessante, em futuros trabalhos, realizar a medição no plasma de hormônios envolvidos, como dosagem de estrogênio, a fim de complementar as análises das fases do ciclo estral, e também como forma de observar a indução da HSR feita pelo mesmo.

O protocolo de desafio térmico que utilizamos é efetivo na indução de HSP70, como visto em estudos do nosso laboratório (DE LEMOS MULLER *et al.*, 2019; SCHROEDER, 2020). A partir deles, seria esperado a ocorrência do aumento da HSP70 nas células submetidas à 42 °C, em relação às incubadas a 37 °C, demonstrando a conservação da integridade da atividade da via e consequente capacidade de indução da HSR. Porém, no resultado da imunodeteção de HSP70 das fêmeas em cada fase do ciclo estral, não foi observada diferença significativa na expressão desta proteína em nenhum grupo específico após o desafio térmico. Entretanto, quando avaliados individualmente, podemos visualizar duas diferentes tendências separando o comportamento dos dados nos grupos: proestro / estro e metaestro / diestro. Essa diferença pode ser confirmada pelo resultado da ANOVA, que demonstrou a influência significativa da fase do ciclo estral ($p = 0,0455$), indicando uma possível relação da alteração das fases do ciclo estral com a HSR, diferença essa que seria esperada nos grupos de fase do ciclo estral cujo estrogênio estivesse ativando a via, em decorrência

do seu pico plasmático (no proestro) e efeito prolongado (no estro), demonstrando uma HSR íntegra.

Olhando para outros tecidos, Nickerson e colaboradores (2006) mostraram que o ciclo estral não impactou significativamente os níveis basais, ou induzidos por estresse agudo *in vivo*, de HSP72 em ratas nas glândulas pituitária e adrenais, nos linfonodos mesentéricos, baço, fígado e ventrículo esquerdo do coração. Estes autores acreditam que as flutuações de estrogênio entre as fases estrais não seriam suficientes para modificar a expressão de HSP70. De acordo, foi hipotetizado que o receptor nuclear de estrogênio periférico alfa (ER α) seria capaz de acomodar essas alterações dos níveis ao longo do tempo (WANG; ERIKSSON; SAHLIN et al, 2000). Interessantemente, a chaperona mais abundante associada ao ER α é a HSP70, demonstrando uma importante associação entre os dois (DHAMAD *et al.*, 2015).

Em outro estudo, Paroo, Dipchand e Noble (2002) encontraram um efeito inibitório do aumento da expressão de HSP70, induzida pós-exercício, na presença do estrogênio em ratas ovarectomizadas com reposição hormonal e ratas íntegras. Porém, os autores não realizaram controle do ciclo estral no trabalho citado, e seus níveis hormonais medidos seriam compatíveis com a fase de diestro, demonstrando que, talvez, essa não fosse a fase indicada para realizar a avaliação da indução da HSR.

As limitações de nosso estudo foram: o *n* amostral ($n = 4$) que nos dá pouco poder estatístico, a quantificação do normalizador vinculina pelo seu resultado no Red Ponceau não é o cenário ideal a ser realizado, e o armazenamento das amostras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por tempo prolongado, que pode ter promovido a degradação do conteúdo da amostra.

Como perspectivas, novos estudos devem ser feitos para se ter mais precisão nos resultados, com um *n* amostral mais robusto. Além disso, assim como nós medimos a expressão de HSP70, seria interessante medir a expressão de outros componentes da via de choque térmico para analisar os resultados de HSR como um todo. Seria interessante também, realizar a dosagem da concentração de NO plasmático das fêmeas, pois o estrogênio estimula a via de HSR através da produção de NO. Então, seria possível analisar indução da via de HSR de acordo com cada fase do ciclo estral. Outra perspectiva é medir a imunodeteção do normalizador pelo mesmo método de quimiluminescência com kit ECL, a qual foi dosada a proteína HSP70.

6 CONCLUSÃO

O nosso estudo piloto demonstrou que a imunodeteção de HSP70 pode ser influenciada pela fase do ciclo estral dos camundongos fêmeos testados, mas que são necessários mais estudos, com um n amostral maior e outras análises de perfil hormonal, para confirmar o nosso resultado.

7 REFERÊNCIAS

- ACHIRAMAN S, ARCHUNAN G, SANKARGANESH D, RAJAGOPAL T, RENGARAJAN RL, ET AL. **Biochemical analysis of female mice urine with reference to endocrine function: a key tool for estrus detection.** *Zoolog Sci* 28: 600–605. 2011
- DHAMAD AE., ZHOU Z, ZHOU J, DU Y. **Systematic Proteomic Identification of the Heat Shock Proteins (Hsp) that Interact with Estrogen Receptor Alpha (ER α) and Biochemical Characterization of the ER α Hsp70 Interaction.** *Plos One*, Aug, 2016.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada.** Manole, 2. ed., 1992, p. 626.
- BIDEN, T.J. BOSLEM, E. CHU, K.Y. SUE, N. **Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, beta cell failure, and tye 2 diabetes mellitus.** *Trends Endocrinol Metab*, 25, n.8, p. 389-398, Aug, 2014.
- BROWN ET, UMINO Y, LOI T, SOLESSIO E, BARLOW R. **Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice.** *Vis Neurosci.* 2005 Sep-Oct;22(5):615-8.
- BYERS SL, WILES MV, DUNN SL, TAFT RA. **Mouse estrous cycle identification tool and images.** *PLoS One.* 2012;7(4):e35538.
- CALDERWOOD, S.K. XIAO, S. **The nside Story: Anti-Inflammatory Roles of HSF1 and Heat Shock Proteins.** In: Asea, A.A. De Maio, A. Heat Shock Proteins: Potent mediators od inflammation and Immunity, vol. 1, acp. 7, Editora Springer, 2007.
- CALIGIONI CS. **Assessing reproductive status/stages in mice.** *Curr Protoc Neurosci* 48(1): A.4I.1–A.4I.8. 2009
- CHABRUN F, DIEU X, ROUSSEAU G, CHUPIN S, LETOURNEL F, PROCACCIO V, BONNEAU D, LENAERS G, SIMARD G, MIREBEAU-PRUNIER D, CHAO DE LA BARCA JM, REYNIER P. **Metabolomics reveals highly regional specificity of cerebral sexual dimorphism in mice.** *Prog Neurobiol.* 2020 Jan;184:101698.
- CHAMPLIN AK, DORR DL, GATES AH. **Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina.** *Biol Reprod* 8: 491–494. 1973
- CLAYTON JA, COLLINS FS. **Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies.** *Nature.* 2014 May 15;509(7500):282-3.
- CRUZAT, V. F.; PANTALEÃO, L. C.; DONATO, J.; DE BITTENCOURT, P. I. et al. **Oral supplementations with free and dipeptide forms of L-glutamine in endotoxemic mice: effects on muscle glutamine-glutathione axis and heat shock proteins.** *J Nutr Biochem*, 25, n. 3, p. 345-352, Mar 2014.
- DAUGAARD, M. ROHDE, M. JAATTELA, M. **The heat shock protein 70 family: higly homologous protein with overlapping and distinct fuctions.** *FEBS Letters* , issue v. 581, issue 19, p. 3702-3710, May, 2007.
- DE LEMOS MULLER, C. H.; DE MATOS, J. R.; GRIGOLO, G. B.; SCHROEDER, H. T. et al. **Exercise Training for the Elderly: Inflammaging and the Central Role**

for **HSP70**. *Journal of Science in Sport and Exercise*, 1, n. 2, p. 97-115, August 01 2019. journal article.

FEBBRAIO, M.A. MESA, J.L. CHUNG, J. STEENSBERG, A et al. **Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans**. *Cell Stress Chaperones*, 9, n. 4, p. 390-396, 2004.

GRANT MKO, SEELIG DM, SHARKEY LC, CHOI WSV, ABDELGAWAD IY, ZORDOKY BN. **Sexual dimorphism of acute doxorubicin-induced nephrotoxicity in C57Bl/6 mice**. *PLoS One*. 2019 Feb 20;14(2):e0212486.

HAMILTON KL, GUPTA S, KNOWLTON AA. **Estrogen and regulation of heat shock protein expression in female cardiomyocytes: cross-talk with NF kappa B signaling**. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Apr;36(4):577-84.

HAMILTON KL, MBAI FN, GUPTA S, KNOWLTON AA. **Estrogen, heat shock proteins, and NFkappaB in human vascular endothelium**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Sep;24(9):1628-33.

KARP NA, MASON J, BEAUDET AL, BENJAMINI Y, BOWER L, BRAUN RE, BROWN SDM, CHESLER EJ, DICKINSON ME, FLENNIKEN AM, FUCHS H, ANGELIS MH, GAO X, GUO S, GREENAWAY S, HELLER R, HERAULT Y, JUSTICE MJ, KURBATOVA N, LELLIOTT CJ, LLOYD KCK, MALLON AM, MANK JE, MASUYA H, MCKERLIE C, MEEHAN TF, MOTT RF, MURRAY SA, PARKINSON H, RAMIREZ-SOLIS R, SANTOS L, SEAVITT JR, SMEDLEY D, SORG T, SPEAK AO, STEEL KP, SVENSON KL; INTERNATIONAL MOUSE PHENOTYPING CONSORTIUM, WAKANA S, WEST D, WELLS S, WESTERBERG H, YAACOBY S, WHITE JK. **Prevalence of sexual dimorphism in mammalian phenotypic traits**. *Nat Commun*. 2017 Jun 26;8:15475.

KNOWLTON AA, SUN L. **Heat-shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat-shock protein expression in the heart**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Jan;280(1):H455-64.

KRAUSE, M LUDWIG, M.S. HECK, T.G. TAKAHASHI, H.K. **Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons**. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 18, n. 4, p 374-380, Jul, 2015.

LEITE, J. S. M.; RAIZEL, R.; HYPÓLITO, T. M.; ROSA, T. D. S. et al. **L-glutamine and L-alanine supplementation increase glutamine-glutathione axis and muscle HSP-27 in rats trained using a progressive high-intensity resistance exercise**. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 41, n. 8, p. 842-849, 2016.

MCLEAN AC, VALENZUELA N, FAI S, BENNETT SA. **Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification**. *J Vis Exp*. 2012 Sep 15;(67):e4389.

MIRAGEM, A. A.; HOMEM DE BITTENCOURT, P. I. **Nitric oxide-heat shock protein axis in menopausal hot flashes: neglected metabolic issues of chronic inflammatory diseases associated with deranged heat shock response**. *Hum Reprod Update*, 23, n. 5, p. 600-628, 09 2017.

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

NEWSHOLME, P.; DE BITTENCOURT, P. I. **The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease**. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 17, n. 4, p. 295-305, Jul 2014.

NEWSHOLME, P.; HOMEM DE BITTENCOURT, P. I. **Gut associated bacteria are critical to metabolism, inflammation and health**. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 19, n. 4, p. 245-249, 07 2016.

NICKERSON M, KENNEDY SL, JOHNSON JD, FLESHNER M. **Sexual dimorphism of the intracellular heat shock protein 72 response**. *J Appl Physiol* (1985). 2006 Aug;101(2):566-75.

OLAZÁBAL UE, PFAFF DW, MOBBS CV. **Sex differences in the regulation of heat shock protein 70 kDa and 90 kDa in the rat ventromedial hypothalamus by estrogen**. *Brain Res*. 1992 Nov 20;596(1-2):311-4.

ORGANIZATION, W. H. **Diabetes**. WHO. 2020.

ORGANIZATION, W. H. **Obesity and overweight**. WHO 2020.

PAROO, Z. DIPCHAND, E.S. NOBLE, EG. **Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle**. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C245–C251, 2002.

PETRY, E. R.; CRUZAT, V. F.; HECK, T. G.; DE BITTENCOURT, P. I. H. et al. **L-glutamine supplementations enhance liver glutamine-glutathione axis and heat shock factor-1 expression in endurance-exercise trained rats**. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 25, n. 2, p. 188-197, 2015.

PETRY, É. R.; CRUZAT, V. F.; HECK, T. G.; LEITE, J. S. M. et al. **Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: involvement of heat shock protein pathways**. *Life sciences*, 94, n. 2, p. 130-136, 2014.

RIUS, B.; LÓPEZ-VICARIO, C.; GONZÁLEZ-PÉRIZ, A.; MORÁN-SALVADOR, E. et al. **Resolution of inflammation in obesity-induced liver disease**. *Front Immunol*, 3, p. 257, 2012.

RYU KJ, PARK HT, KWON DH, YANG KS, KIM YJ, YI KW, SHIN JH, HUR JY, KIM T. **Vasomotor symptoms and metabolic syndrome in Korean postmenopausal women**. *Menopause* 2015;22:1239–1245.

SCHROEDER, H T **Acompanhamento temporal da composição corporal, sensibilidade à insulina e inflamação de baixo grau em camundongos C57BL/6J e os efeitos do tratamento hipertérmico**. Porto Alegre, 2020 [Dissertação], disponível em: < <http://hdl.handle.net/10183/206844>>.

SCHUSTER JP, SCHAUB GA. **Trypanosoma cruzi: the development of estrus cycle and parasitemia in female mice maintained with or without male pheromones**. *Parasitol Res*. 2001 Dec;87(12):985-93.

SINGH, I. S.; HASDAY, J. D. **Fever, hyperthermia and the heat shock response.** Int J Hyperthermia, 29, n. 5, p. 423-435, Aug 2013.

STICE JP, CHEN L, KIM SC, JUNG JS, TRAN AL, LIU TT, KNOWLTON AA. **17 β -Estradiol, aging, inflammation, and the stress response in the female heart.** Endocrinology. 2011 Apr;152(4):1589-98.

THURSTON RC, EL KHOUDARY SR, SUTTON-TYRRELL K, CRANDALL CJ, STERNFELD B, JOFFE H, GOLD EB, SELZER F, MATTHEWS KA. **Vasomotor symptoms and insulin resistance in the study of women's health across the nation.** J Clin Endocrinol Metab 2012a;97: 3487-3494.

THURSTON RC, JOFFE H. **Vasomotor symptoms and menopause: findings from the Study of Women's Health across the Nation.** Obstet Gynecol Clin North Am. 2011 Sep;38(3):489-501.

VAN DIJK GM, MANEVA M, COLPANI V, DHANA K, MUKA T, JASPERS L, KAVOUSI M, FRANCO OH. **The association between vasomotor symptoms and metabolic health in peri- and postmenopausal women: a systematic review.** Maturitas 2015; 80:140–147

WANG H, ERIKSSON H, AND SAHLIN L. **Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle.** *Biol Reprod* 63: 1331–1340, 2000.

YOO, C. LEE, S. LEE, C. KIM, Y.W. HAN, SK. SHIM, Y. **Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I κ B α through preventing I κ B kinase activation in respiratory epithelial cells.** Journal of Immunology, vol. 164, p. 5416-5423, 2000.