

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISILOGIA**

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

ANTÔNIO AZAMBUJA MIRAGEM

Porto Alegre

2015

ANTÔNIO AZAMBUJA MIRAGEM

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

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia.

ORIENTADOR: PAULO IVO HOMEM DE BITTENCOURT JR

Porto Alegre

2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial minha esposa Clarisse e meus filhos Felipe e Arthur por simplesmente estarem na minha vida e caminharem ao meu lado com muito amor todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, especial minha esposa Clarisse e meus filhos Felipe e Arthur por me apoiarem em absolutamente todos os momentos, para que este trabalho fosse, assim realizado.

Agradeço aos meus pais Abrelino e Maria de Lourdes (*in memoriam*), por terem me ensinado o valor de estudar sempre, e não desistir nunca! Muito obrigado de coração!

Agradeço aos meus queridos sogros Carlos e Regina por estarem sempre a disposição para me ajudar, a qualquer tempo, literalmente! Com carinho, gratidão e respeito, muito obrigado!

Agradeço também aos muitos amigos que a ciência me proporcionou conhecer, e que certamente sem a presença deles este trabalho não existiria. Com especial carinho aos meus colegas do Laboratório de Fisiologia Celular: Maciel Bruxel, Sofia Scomazzon, Rossana Porto, Cinthia Schöler, Patricia Bock, Aline Bittencourt, Luiz Zavarize, Bolívar Bandeira, Inês Lavina e Helena Schroeder pela disponibilidade, respeito e carinho em todos os momentos que estivemos juntos, muito obrigado!

Agradeço de forma inestimável ao Laboratório de Ensaios Biológicos e ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/UNIJUÍ) pelo acolhimento e acima de tudo dedicação e excelência no estudo da fisiologia. Agradeço em especial os colegas e amigos: Iberê Machado, Fernanda Baldissera, Analú Bender, Pauline Goettems, Bethania Salamoni, Renan Basso, Maicon Sulzbacher, Eloisa Basso, Yohanna Donato, Yana Sandri, Matias Frizzo, Greice dos Santos e João Felipe Rezer que formam um competente equipe de trabalho, obrigado!

Agradeço de forma muito especial aos amigos, Professores Thiago Heck e Mirna Ludwig por todo o carinho, paciência e principalmente competência que compartilharam comigo nesta caminhada e seguem compartilhando através do exemplo de seriedade e comprometimento que demonstram a frente do GPeF,

registro aqui minha gratidão que certamente as palavras não são capazes de resumir, muito obrigado!

Gostaria de agradecer à Professora Poli Mara Spritzer pela confiança e disponibilidade sempre que foi preciso, muito obrigado!

De forma muito, mas muito especial, quero agradecer ao meu amigo Guilherme Sant'Helena que sempre esteve disponível para muitos momentos de tarefas neste estudo, bem como profundas reflexões profissionais, obrigado!

Agradeço à querida Míriam Sant'Helena que de forma espetacular sempre expressou o cuidado, carinho, respeito e principalmente a sua sinceridade comigo ao longo de todos estes anos que nos conhecemos, obrigado do fundo do coração! Fostes e sempre serás muito importante pra mim, assim com foste para a concretização deste trabalho!

Enfim, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr, por todo o esforço para que este trabalho fosse realizado. Desejo agradecer também pelo exemplo que és como cientista, pessoa, e também, como professor. Com profunda admiração, respeito e acima de tudo muito carinho, o meu MUITO OBRIGADO!

“O homem por natureza deseja conhecer.”
(Aristóteles)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
LISTA DE FÓRMULAS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	18
Hipertermia, HSPs e <i>Heat Shock Response</i>	18
Estrogênio e a <i>Heat Shock Response</i>	28
A menopausa e suas adaptações	32
Proteínas de choque térmico e o fogacho menopáusico	35
OBJETIVOS	48
Objetivo geral	48
Objetivos específicos	48
MATERIAL E MÉTODOS	49
Delineamento do estudo	49
Animais	49
Detalhamento experimental	51
Protocolo de castração (ovariectomia bilateral)	53
Protocolo de choque térmico (<i>hot tub session</i>)	54
Determinação da fase do ciclo estral	56
Teste de Tolerância à Glicose via Intra Peritoneal (TTGip)	57
Medida da temperatura dos animais	58
Métodos de análise	59
Preparação dos Tecidos	59
Dosagem de Proteínas e Teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	61
Determinação da superóxido dismutase e catalase plasmáticas	62
Parâmetros hematológicos – Hemograma	63
Velocidade de Hemossedimentação (VHS)	63
Determinação da proteína C Reativa	64

Expressão de HSP70	65
Dosagem de eHSP70 em plasma	67
Dosagem de 17 β -estradiol	68
Cálculo do número amostral	69
Análise estatística	69
Aspectos éticos e de biossegurança	70
Equipamentos de biossegurança	72
Licenças especiais	72
RESULTADOS	73
DISCUSSÃO	86
CONCLUSÃO	93
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	94
ANEXO I – ARTIGO PUBLICADO - REVISTA MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY: <i>Estrogen deprivation does not affect vascular heat shock response in female rats: a comparison with oxidative stress markers</i>	118
ANEXO II – ARTIGO SUBMETIDO: <i>Are menopausal hot flushes a hypothalamic attempt to retrieve a normal heat shock response in the absence of HSP70- inducing estrogens</i>	132

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A hipótese Fogacho/HSP70. Apresenta o período pré menopausa, mostrando o esquema da estrutura do eixo hipotálamo-hipófise-ovários (HHOv) e a partir da produção normal de estrogênio (E2) pelos ovários, ocorre a indução de HSP70, via HSR (*Heat Shock Response*) 41
- Figura 2.** A hipótese Fogacho/HSP70. Apresenta o período pós menopausa, mostrando o esquema da estrutura do eixo hipotálamo-hipófise-ovários (HHOv) e a partir da redução da produção de estrogênio (E2) pelos ovários, alterando a regulação da *Heat Shock Response* 42
- Figura 3.** A hipótese Fogacho/HSP70. Apresenta as possíveis vias de resposta ao choque térmico, reestabelecendo a expressão de HSP72 e suas interações com o eixo hipotálamo-hipófise-ovários (HHOv), via HSR (*Heat Shock Response*) 43
- Figura 4.** Estrutura para a realização da sessão de choque térmico experimental, por banho de imersão corporal 55
- Figura 5.** Foto do equipamento utilizado para o monitoramentos dos valores glicêmicos de ratas Wistas submetidas ao choque térmico57
- Figura 6.** Foto ilustrativa do procedimento de medida da temperatura corporal dos animais submetidos as intervenções previstas no estudo 58
- Figura 7.** Estrutura anatômica dissecada para a preservação dos segmentos da aorta, coração e rins..... 60
- Figura 8.** Gráficos das temperaturas corporais médias dos animais submetidos ao banho de imersão à 36°C (A) grupo controle e (C) grupo ovariectomia; banho de imersão à 42°C (B) grupo choque térmico e (D) grupo choque térmico + ovariectomia 74
- Figura 9.** Peso corporal médio dos grupos experimentais no momento pré-cirúrgico para ovariectomia bilateral ou *sham operation*; pós *washout* hormonal; e pós jejum de 12h, imediatamente antes do início do TTGip 75
- Figura 10.** Imagem representativa de esfregaço vaginal, coradas pelo método Shorr (Shorr, 1941), imediatamente antes do TTGip. Identificação da fase do ciclo estral, durante o período principal (semana da intervenção) dos animais do experimento 76
- Figura 11.** Expressão de iHSP70, por Western Blot, no arco aórtico de ratas Wistar submetidas a sessão de choque térmico, através de banho de imersão

corporal. O sangue foi coletado 12h após o término do choque térmico, ao final do TTGip 78

Figura 12. Concentração plasmática de eHSP70, por ELISA, de ratas Wistar submetidas a sessão de choque térmico, através de banho de imersão corporal. O sangue foi coletado 12h após o término do choque térmico, ao final do TTGip 79

Figura 13. Níveis séricos de 17β -estradiol medidos por imunoenensaio quimioluminescente competitivo. Sangue coletado 12h após o término do choque térmico, ao final do TTGip80

Figura 14. Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGip) realizado nos grupos experimentais: controle (C), ovariectomizado (OVX), choque térmico (HS) e choque térmico + ovariectomia (HS+OVX). Doze horas após a sessão de choque térmico, os animais receberam injeção intraperitoneal, com dose única de glicose (1g/kg) 82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Peso e temperature corporal dos animais dos grupos controle (C), ovariectomizado (OVX) e seus grupos emparelhados, submetidos ou não a sessão de choque térmico (grupos HS e OVX+HS) 83

TABELA 2. Conteúdo intracelular de HSP70 no arco aórtico e parâmetros bioquímicos plasmáticos dos animais dos grupos controle (C), ovariectomizado (OVX) e seus grupos emparelhados, submetidos ou não a sessão de choque térmico (grupos HS e OVX+HS) 84

TABELA 3. Parâmetros hematológicos de ratas Wistar dos grupos controle (C), ovariectomizado (OVX) e seus grupos emparelhados, submetidos ou não a sessão de choque térmico (grupos HS e OVX+HS) 85

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	Proteína quinase B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BHT	Hidroxitolueno butilado
C	Grupo Controle
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CAT	Catalase
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX2	Ciclo-oxigenase-2
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biotecnologia
cyPG	Prostaglandinas ciclopentenônicas
DCV	Doenças cardiovasculares
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DnaK	Proteína de choque térmico de 70 kDa (<i>E. coli</i>)
E2	17 β -estradiol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ER α	Receptor de estrogênio subtipo α
ER β	Receptor de estrogênio subtipo β
FSH	Hormônio folículo estimulante
HeLa	Abreviatura de Henrietta Lacks, doadora da linhagem celular
HS	<i>Heat Shock</i>

HSE	<i>Heat Shock Element</i>
HSF-1	<i>Heat Shock Factor 1</i>
HSP	Proteína de choque térmico
HSPA1A	Gene codificador de HSP70 induzível
HSPA8	Gene codificador de HSP70 constitutiva
HuR	Human antigen R
IAUC	Área incremental sob a curva
ICAM	Molécula de adesão intercelular
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
iHSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa intracelular
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
I-R	Isquemia/reperfusão
I κ B α	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
JNK	c-Jun N-terminal quinases
kDa	Quilodalton
KO	<i>knockout</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LH	Hormônio luteinizante
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MDA	Malondialdeído
MISS	<i>Membrane Initiated Steroid Signaling</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF-K β	Factor nuclear kappa B
NIH	National Institutes of Health
OVX	Ovariectomizadas
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PI3K	Fosfatidil-inositol 3 –kinase
PKC	Proteína kinase C
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PX	Peroxidases

RSS	Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SIRT1	Proteína Sirtuína 1
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutases
T	Temperatura
TBARS	Teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
Tc	Temperatura corporal
TCA	Ácido tricloroacético
TEN	Tris-EDTA-NaCl
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
TTGip	Teste de Tolerância a Glicose intraperitoneal
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

LISTA DE FÓRMULAS

H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
NH_3	Amônia
NO	Óxido nítrico

RESUMO

Os fogachos são a queixa mais comum das mulheres peri- e pós-menopausa e estão fortemente relacionados com a diminuição dos níveis de estrogênio. No entanto, a fisiopatologia deste sintoma vasomotor muito desagradável é ainda desconhecido. Por outro lado, o estradiol (E2) apresenta a capacidade de induzir a expressão de HSP72, um membro da família de 70 kDa das proteínas de choque térmico (HSP70), que são citoprotetoras e cardioprotetoras. Sabe-se que a expressão HSP70 é comprometida em doenças inflamatórias relacionadas com o envelhecimento. Por isso, questionamos se a capacidade do organismo de desencadear uma resposta ao choque térmico (*Heat Shock Response*) robusta, estaria ainda presente após a retirada, via castração, do E2. Para tanto, foram estudados os efeitos do choque térmico (*Heat Shock* - HS), através de uma sessão de banho de imersão, em ratas Wistar submetidas a ovariectomia bilateral (OVX), após um período de *washout* hormonal de 7 dias. Doze horas após o HS, os animais foram mortos e o arco aórtico foi excisado cirurgicamente para análises moleculares. Os resultados foram comparados com os marcadores de estresse oxidativo no plasma (superóxido dismutase, catalase e lipoperoxidação), pois é bem estabelecido que a expressão de HSP70 é sensível a regulação redox. A relação entre a iHSP70 (intracelular) e a eHSP70 (extracelular/plasma), proposto como um índice do estado inflamatório sistêmico, também foi investigada. Os resultados mostraram que a *Heat Shock Response* continua preservada em animais OVX, como inferido a partir da expressão de HSP70 (até 40% de aumento, $p < 0,01$) nas aortas, o que não foi acompanhado por nenhuma outra alteração em marcadores de estresse oxidativo, parâmetros hematológicos e no controle glicêmico. Desta forma, sugerimos que a avaliação periódica do *status* de HSP70 (iHSP70 vs eHSP70) pode ser de extrema relevância clínica, pois a diminuição da capacidade de defesa do organismo via *Heat Shock Response* está no centro do aparecimento de disfunções relacionadas com a menopausa.

Palavras-chave: proteínas de choque térmico; HSP70; privação de estrogênio; menopausa; resposta ao estresse.

ABSTRACT

Hot flashes, the most common complaint of peri- and postmenopausal women, are tightly related to decrease in estrogen levels. However, the pathophysiology of this very unpleasant vasomotor symptom is greatly unknown. On the other hand, estradiol (E2) has been found to induce the expression of HSP72, a member of the 70 kDa family of heat shock proteins (HSP70), which are cytoprotective and cardioprotective. Since it has been noticed that HSP70 expression is compromised in age-related inflammatory diseases, we argued whether the capacity of triggering a robust heat shock (HS) response would be still present after E2 withdrawal. Hence, we studied the effects of HS treatment (hot tub) in female Wistar rats subjected to bilateral oophorectomy (OVX) after a 7 day washout period. Twelve hours after HS, the animals were killed and aortic arches were surgically excised for molecular analyses. The results were compared with oxidative stress markers in the plasma (superoxide dismutase, catalase and lipoperoxidation) because HSP70 expression is sensitive to redox regulation. Extracellular (plasma) to intracellular HSP70 ratio, an index of systemic inflammatory status, was also investigated. The results showed that HS response was preserved in OVX animals, as inferred from HSP70 expression (up to 40% rise, $p < 0.01$) in the aortas, which was accompanied by no further alterations in oxidative stress, hematological parameters and glycemic control either. As a consequence, periodic evaluation of HSP70 status (iHSP70 vs eHSP70) may be of clinical relevance because decreased HS response capacity is at the center of the onset of menopause-related dysfunctions.

Keywords: heat shock proteins; HSP70; estrogen deprivation; menopause; stress response.

INTRODUÇÃO

Hipertermia, Proteínas de Choque Térmico (Heat Shock Protein) e a Resposta ao Choque Térmico (Heat Shock Response)

Durante o processo de resposta inflamatória (incluindo a fase de resolução da inflamação), ocorre no ambiente celular um conjunto coordenado de eventos transcricionais, centrados em fatores de transcrição da família κ B (por exemplo, NF- κ B) (Oeckinghaus & Ghosh, 2009), responsáveis pela condução da inflamação durante a fase inicial, mas ao mesmo tempo direcionando a sua resolução. No início da resposta inflamatória e sob o controle de NF κ B, enzimas induzíveis (incluindo a ciclo-oxigenase 2; COX 2), modula a síntese de PGE₂, a qual é capaz de induzir uma hipertermia a partir de alterações nos limiares de temperatura corporal, dentro do SNC, levando à febre. Esta elevação de temperatura corporal desencadeia um processo, altamente conservado filogeneticamente, chamado resposta ao choque térmico (*Heat Shock Response*). Este mecanismo ativa um programa de transcrição gênica a partir do Fator de Transcrição de Choque Térmico – 1 (*HSF-1; Heat Shock Factor – 1*) (Singh & Hasday, 2013). Como resultado da ativação de HSF-1, a célula aumenta de forma significativa a expressão de proteínas de choque térmico (HSP – Heat Shock Protein), cuja maior representante é a família de HSP de 70 kDa (HSP70).

Virtualmente todos os organismos vivos testados respondem às alterações ambientais e fisiológicas, por meio da síntese de um conjunto de proteínas, as mais conhecidas são as proteínas de estresse ou proteínas de choque térmico (HSP – *heat shock protein*) (Morimoto, 1998; Liu, Gampert *et al.*,

2006). Por desempenhar papel importante no enovelamento proteico, assim como no trânsito intra e extra celular de proteínas, as HSPs também são denominadas acompanhantes ou chaperonas (do inglês, *chaperon*) moleculares (Fauconneau, Petegnief *et al.*, 2002). As HSPs, são frutos da descoberta do cientista italiano Ferruccio Ritossa na década de 1960 (Ritossa, 1996; De Maio *et al.*, 2012). Acidentalmente, células de glândulas salivares de *Drosophila buskii* foram expostas a um choque térmico ($\approx 5^{\circ}\text{C}$ acima da sua temperatura normal), o que possibilitou a observação de um espessamento cromossomal (Ritossa, 1962), levando à rápida regulação positiva de uma família de genes responsáveis pela síntese de uma classe de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (Tissieres, 1974).

As famílias de HSPs são classificadas de acordo com o seu peso molecular, que pode variar de 10 a 150 kDa e são encontradas nos principais compartimentos celulares. Assim, as famílias são divididas em HSP10, pequenas HSPs, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, and HSP110. (Hartl e Hartl, 2002; Kampinga *et al.*, 2009). Em foco, a família de HSPs de 70 kDa (HSP70), corresponde ao conjunto de proteínas com pesos moleculares entre 66 a 78 kDa. O destaque ao papel das HSPs70 se dá devido a sua alta expressão induzida, em células de mamíferos, sob diversas condições de estresse e por ser uma proteína altamente conservada filogeneticamente, encontrada desde arqueobactérias (DnaK - ≈ 70 kDa), eubactérias, organismos procariontes, eucariontes de baixa complexidade como leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e insetos (*Drosophila melanogaster*), até mamíferos como ratos (*Rattus norvegicus*), camundongos (*Mus musculus*) e humanos (*Homo sapiens sapiens*)

o que destaca sua importância evolutiva (Lindquist and Craig, 1988; Morimoto, 1998).

Ainda, no genoma humano encontra-se, já descrito, mais de quarenta sequências para HSP70. Muitos deles são considerados *pseudo genes*, mas há pelo menos treze genes HSP70 distintos amplamente estudados até o final da última década (Henderson and Pockley, 2010; Henderson and Pockley, 2012) e onze destes genes, localizados em vários cromossomos, são efetivamente traduzidos em proteína (Brocchieri et al, 2008).

Enquanto a forma constitutiva (Hsc70, HSP73 – HSPA8) é expressa numa grande variedade de tipos de células em nível basal (sendo apenas moderadamente induzível), as induzíveis por estresse (HSP72 – HSPA1A) dificilmente são detectadas em condições de ausência de injúria celular (Kampinga et al., 2009). Assim, HSP72 pode ser prontamente sintetizada sob uma condição de desequilíbrio homeostático. Exemplos deste estado de "ameaça à homeostase" são: estresse oxidativo e exercício (Krause et al., 2007), hipóxia (Patel et al., 1995), infecção viral (Collins and Hightower, 1982), contaminação por metais pesados (Said et al., 2010), isquemia (Richard et al., 1996), estresse metabólico (Beckmann et al., 1992); fatores ambientais - poluição/agrotóxicos (Nadeau et al., 2001; Mukhopadhyay et al., 2003), dentre outros. Ainda neste contexto, as pequenas proteínas de choque térmico induzidas por febre, tal como HSP27, também contribuem para a citoproteção (de Thonel et al, 2012.; Tang et al., 2013). Este aumento na expressão HSP70 induzida por HSF1 será responsável pela defesa da célula contra um estresse proteotóxico, buscando reestabelecer a proteostase (homeostase proteica), conferindo, então citoproteção (Anckar & Sistonen, 2011).

Além do seu papel na manutenção da proteostase celular, atuando como uma chaperona molecular, regulando a formação de agregados proteicos e reverter a desnaturação de proteínas, HSP70 é capaz de associar-se com o complexo formado por NF- κ B com o seu inibidor (I κ B) impedindo assim a translocação para o núcleo do fator de transcrição inflamatório (Chen et al., 2005). Portanto, a HSR é de fato uma resposta anti-inflamatória, uma vez que as proteínas NF- κ B-dependentes estão no centro de praticamente todas as respostas inflamatórias (Newsholme e Homem de Bittencourt, 2014), para revisão). Além disso, a prostaglandina E2 (PGE₂) e outras PGs produzidas durante o início da inflamação podem ser convertidos nos seus respectivos produtos de desidratação, tais como PGA₂ e PGs da família J, os quais são prostaglandinas ciclopentenônicas (cyPGs), α β -insaturadas, que possuem um alto poder anti-inflamatório demonstrado tanto em ensaios *in vitro*, quanto *in vivo* (Gutierrez et al., 2008). Conforme demonstrado em estudos clássicos pelo grupo da Professora Maria Gabriella Santoro na Itália, a inibição da ativação de NF- κ B é parcialmente dependente de cyPGs, pois as cyPGs são fortes indutores fisiológicos de HSP70, tanto quanto a resposta ao choque térmico. Em outras palavras, a ação anti-inflamatória das cyPGs será máxima somente quando a expressão de HSP70 for elevada (Rossi et al., 1997). Além disso, cyPGs são compostos anti-inflamatórios derivados da inflamação em virtude da inibição direta da quinase I κ B- β (IKK β), que fosforila I κ B levando à ativação de NF κ B durante a inflamação (Rossi et al., 2000). Estudos recentes mostraram que HSF-1 ativado a partir de choque térmico controla diretamente a transcrição de COX 2, permitindo, assim, um alto rendimento na produção de PGE₂ durante a inflamação (Rossi et al., 2012).

A *Heat Shock Response (HSR)* desempenha um papel crucial para promover a resolução da inflamação. Numerosos estudos, no entanto, indicaram que a HSR está gravemente prejudicada em tecidos metabólicos durante inflamação crônica. No que diz respeito à resistência à insulina e diabetes tipo 2, verificou-se que a expressão de mRNA que codifica para a forma induzível de HSP70 (gene HSPA1A) foi dramaticamente reduzida (90% de decréscimo) em biópsias musculares esqueléticas dos pacientes com diabetes tipo 2, em comparação com voluntários saudáveis (Kurucz et al., 2002). Observações semelhantes foram relatadas em pacientes diabéticos (DM2) obesos e não obesos, em que uma acentuada redução na expressão de proteínas de HSP70 foi detectada na comparação com os indivíduos controles obesos (Rodrigues-Krause et al., 2012). Além disso, os pacientes com diabetes de tipo 2 apresentam diminuição na expressão intramuscular de ambas moléculas, HSP70 e hemeoxigenase (Bruce et al., 2003), de modo que as defesas anti-inflamatórias e antioxidantes associadas à HSR estão seriamente comprometidas, reflexo do desequilíbrio do estado redox, decorrente da alta produção de óxido nítrico (NO) via NOS2, associada a uma disfunção na cascata de sinalização do receptor de insulina por S-nitrosação, levando assim ao quadro inflamatório (Carvalho-Filho et al., 2005).

Estudos em nosso laboratório (DiNaso et al., 2014) observaram que o eixo HSF1-HSP70 é progressivamente suprimido no tecido adiposo e fígado de pacientes obesos resistentes à insulina, como o que ocorre na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), a qual evolui de esteatose, para formas mais inflamatórias da doença (e.g. esteato-hepatite acompanhada por fibrose). A supressão do eixo HSF1-HSP70 está fortemente correlacionada com o grau de

aumento da expressão de ambas, JNK1 e JNK2 no tecido adiposo, o que foi seguido por aumentos semelhantes nos valores de JNK1 e JNK2 difosforilados (Thr183 / Tyr185). Assim, o padrão do tecido adiposo de pacientes resistentes à insulina (*low-grade inflammation*) está associado diretamente com uma HSR suprimida. Esta é uma situação complexa porque HSP70 induzida pelo estresse inibe a transdução de sinal dependente da JNK (Calapre et al., 2013).

O comprometimento da HSR é elemento chave para o aumento dos fatores de risco de desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas, uma vez que o aumento da expressão de HSP70 demonstrado ser citoprotetor contra a resistência à insulina induzida por obesidade em humanos e modelos animais de obesidade (Chung et al., 2008). Assim, as modificações corporais durante o climatério, tanto em nível metabólico, quanto na distribuição da gordura corporal (remodelamento do tecido adiposo), bem como o desenvolvimento de resistência à insulina e DM2, permeiam as adaptações fisiológicas da transição menopáusicas.

De fato, a *Heat Shock Response* (HSR) é um processo fundamental para promover a manutenção da homeostase celular. O acúmulo deletério de proteínas desnaturadas é o cenário primário para a resposta celular ao estresse. Está bem estabelecido que outros fatores *a priori* são responsáveis por desencadear a HSR, uma vez que a célula não reconhece a temperatura *per se*, e as alterações de níveis hormonais, como ocorre em mulheres na menopausa pode desencadear este processo (Hamilton et al., 2004; Stice & Knowlton, 2008). Muitos trabalhos, no entanto, indicaram que a HSR é severamente prejudicada nos tecidos metabólicos durante os processos de inflamação crônica e disfunções metabólicas (Rajagopalan e Brook, 2012) e que a participação

moduladora do estrogênio exerce papel central na etiologia inflamatória (por favor, veja (Monteiro et al., 2014) para revisão).

De forma similar, o estresse do retículo endoplasmático (ERE), também chamado de resposta a proteínas desdobradas (UPR, do inglês *unfolded protein response*), é uma via conservada evolutivamente projetada para atuar na manutenção da proteostase e apresenta-se suscetível a diversos fatores de estresse fisiopatológicos igualmente a HSR (Walter e Ron, 2011).

Por outro lado, o fenótipo secretor associado à senescência (SASP, do inglês *senescence-associated secretory phenotype*) é um mecanismo alternativo para a UPR, o qual tenta evitar a morte celular por apoptose, resultado de uma HSR anti-inflamatória ineficaz. Estudos recentes (Tchkonia et al, 2010) apresentaram a hipótese de que um estado semelhante ao senescente pode surgir em células de gordura de indivíduos obesos (mesmo jovens obesos), sendo esta uma resposta adaptativa a super utilização das células de gordura que se assemelha ao envelhecimento celular. No entanto, a presença de antígeno humano R (HuR, do inglês *Human antigen R*) melhora a estabilidade de numerosos mRNAs alvo, incluindo o que codifica a proteína Sirtuína 1 (SIRT1), através de associação de HuR à região 3' não traduzida do mRNA para SIRT1, que promove um aumento no nível de expressão desta proteína (Abdelmohsen et al., 2007).

SIRT1 potencializa a expressão de HSF1 (Kim et al., 2012), uma vez que, a ativação de SIRT1 prolonga ligação HSF1 aos promotores de genes responsivos ao choque térmico, mantendo HSF1 em um estado ativado ligado ao DNA (Westerheide et al., 2009), ao passo que o choque térmico, por si só, é capaz de aumentar a razão NAD⁺/NADH celular, o que leva ao aumento do

recrutamento de SIRT1 para o promotor de HSP70 (Raynes et al., 2013). Enquanto que a redução de SIRT1, ao contrário, atenua a resposta ao choque térmico (Liu et al., 2014), moduladores de SIRT1 também foram encontrados regulando a atividade de HSF1 e consequente resposta ao choque térmico em células da linhagem HeLa (Raynes et al., 2013). E ainda, numerosos estudos destacam a estreita ligação entre a resposta ao choque térmico induzida pela restrição calórica e pelo exercício, através da participação de vias antissenescentes de SIRT1, e do estresse metabólico, em que a indução de chaperonas durante a resposta ao choque térmico demonstra papel protetor do metabolismo, reduzindo o risco de desenvolvimento de síndrome metabólica e doenças relacionadas à idade (Dancsó et al., 2008). Portanto, a interação HuR-SIRT1 é fundamental para os efeitos benéficos anti-inflamatórios e antissenescentes da *Heat Shock Response* (HSR).

É consenso que o estresse térmico irá induzir a expressão de HSP70 via HSF1, protegendo a célula contra fatores proteotóxicos, buscando manter a proteostase (homeostase proteica) e consequente citoproteção (Anckar; Sistonen, 2007). Além disso, a hipertermia potencializa a expressão de *Toll-like receptor-4* (TLR4), bem como sua via de sinalização *in vivo* (Gupta et al., 2012; Gupta et al., 2013), enquanto TLR2, TLR3 e TLR4 atuam sinergicamente com a hipertermia associada a febre para induzir a expressão de HSP70 e liberá-la no espaço extracelular em ambos modelos, *in vivo* e *in vitro* (Gupta et al., 2013)

Neste sentido, diferentes intervenções estão sendo propostas para reestabelecer as defesas celulares via HSR. Tratamentos farmacológicos (e.g., o BGP-15 derivado de hidroxilamina, um coindutor de HSP, agora sob ensaio clínico), bem como fisiológicos (hipertermia, imersão corporal) começam a ser

considerados como métodos terapêuticos promissores para DMT2 (Hooper et al., 2014). Recentemente, Krause e colaboradores indicaram abordagens experimentais para o tratamento à base de hipertermia de doenças inflamatórias (Krause et al, 2015). Além disso, em nosso laboratório, utilizando um modelo animal de aterosclerose (camundongo KO para receptor de LDL), submetidas a choque térmico (41,5 ° C durante 15 min) uma vez por semana, ao longo de 8 semanas, observou uma redução significativa da doença vascular, um aumento no fluxo sanguíneo e uma redução de proteínas inflamatórias associadas a HSR no arco aórtico (Bruxel et al., manuscrito em preparação).

A interação entre obesidade, diabetes, doença cardiovascular, inflamação crônica e as vias de HSP70 compreende uma complexa operação em nível de regulação gênica. A região promotora de $TNF\alpha$ contém um sítio de ligação para HSF1, o qual é capaz de reprimir a transcrição do $TNF\alpha$. Desta forma, com a reduzida atividade de HSF1 devido a disfunção da HSR, conforme anteriormente descrito, a ausência do elemento repressor (HSF1), ocorre uma contínua transcrição de $TNF\alpha$ (Singh et al., 2002), o que possivelmente explica por que animais KO para HSF1 estão associados com o aumento crônico nos níveis $TNF\alpha$ e aumento da susceptibilidade à desafios endotóxicos (Calapre et al. 2013; Wu et al., 2013) A regulação desta modulação gênica no sentido oposto também é possível. $TNF\alpha$ pode transitoriamente reprimir a ativação de HSF1 (Knowlton, 2006). Além disso, estudos demonstraram que JNK1 fosforila HSF1 em seu domínio regulatório causando a supressão da atividade transcricional de HSF1, enquanto que HSP70 previne a ativação de Bax por inibir a via JNK/Bim (Li et al., 2010; Wu et al., 2013).

A redução na expressão de HSP70 em pacientes obesos foi correlacionada com a supressão da expressão proteica de HSF1 (Rodrigues-Krause et al., 2012), um efeito também observado em modelo animal de aterosclerose em nosso laboratório (Bruxel et al., manuscrito em preparação).

Estrogênio e a Resposta ao Choque Térmico (Heat Shock Response)

Os estrogênios, hormônios esteroides, inicialmente descritos por suas ações exclusivamente genômicas, através do acoplamento e translocação nuclear de seus receptores, exercem diversas funções em todo o organismo (Velarde, 2013; Moggs and Orphanides, 2001). Além dos seus efeitos nucleares, existem ações deslocadas do núcleo (citoplasmáticas e na membrana celular), bem como ações diretas e indiretas independente de receptor ou do próprio receptor não ligado ao hormônio. Os benefícios fisiológicos atribuídos às respostas desencadeadas pelos estrogênios, principalmente no sistema nervoso central (SNC) e sistema cardiovascular são provenientes do 17β -estradiol (E2). Principal estrogênio biologicamente ativo, E2 elenca entre suas características as propriedades antioxidantes e vasodilatadoras. Embora, alguns efeitos dos estrogênios sejam amplamente conhecidos, a relação entre o hormônio, outras biomoléculas (possíveis biomarcadores) e diferentes vias de sinalização celulares (e possíveis interação) seguem desconhecidas. Considerado um hormônio pleiotrópico, desempenha papel metabólico fundamental em todos os sistemas do organismo, incluindo o tecido adiposo, muscular, esquelético, nervoso e cardiovascular (Pellegrini et al., 2014; Kim et al., 2014a; Kim et al., 2014b, Krebs et al., 1999; Meyer et al., 2014). Muitos dos efeitos do E2 são considerados citoprotetores. Com efeito, no sistema cardiovascular, E2 exerce ações antioxidantes por induzir alterações no perfil lipídico, através da elevação do HDL, diminuição do LDL e ativação da eNOS e produção de NO (Subbiah et al., 1993; Sack et al., 1994; Guetta et al., 1995; Brussard et al., 1997). Além disso, E2 regula a produção de outras biomoléculas vaso ativas como as

prostaglandinas (Mueck et al., 2002; Sobrino et al., 2010) e proteínas de estresse (HSPs) (Hamilton et al., 2004a; Hamilton et al., 2004b; Stice and Knowlton, 2008; Stice et al., 2011), estes elementos bioativos tem relação direta com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Estudos demonstram que o estrogênio confere citoproteção cardiovascular através de regulação positiva de diferentes proteínas de choque térmico (HSPs), como HSP27, HSP60, HSP90, e em especial a HSP70 (Wick et al., 2014; Lu and Kakkar, 2010), reforçando a forte relação entre o estrogênio e a resposta ao estresse.

Uma vez estimuladas, as células são capazes de promover rápidas adaptações (e.g. síntese proteica) para a manutenção da homeostase e sobrevivência celular. A exposição a estas situações de estresse (em nível sub letal) desencadeia uma cascata de sinalização, por vezes reparadora, através da indução da transcrição de genes específicos (Brocchieri et al, 2008). Os produtos destes genes estarão relacionados com a sobrevivência ou morte das células, de acordo com a capacidade adaptativa a tais condições de estresse. Em células eucariotas, a resposta ao choque térmico é regulada por regiões altamente conservadas do DNA chamadas elementos de choque térmico (HSE) e também por proteínas associadas ao DNA igualmente conservadas, denominadas fator de transcrição de choque térmico (HSF) (Morimoto, 1998).

HSPs e estrogênio apresentam inter-relação citoprotetora conhecida no sistema cardiovascular. Estudos demonstram que ratas fêmeas têm mais HSP72 do que macho no tecido cardíaco (Voss et al., 2003). Apesar da diferença endócrina de gêneros já exercida pelo hormônio ovariano, soma-se uma maior disponibilidade de HSP72 no tecido cardíaco, e quando células cardíacas de ratos foram tratados com estrogênio ocorreu uma super expressão HSP72,

acompanhada de HSP90 (Hamilton et al., 2004a). Comparativamente, a relação entre estrogênio e HSP70 parece estar acontecendo de forma inversa no músculo esquelético. Estudos demonstraram que ratos machos responderam com uma maior indução de HSP70 no músculo esquelético após exercício do que as fêmeas. Além disso, esta variação no padrão de resposta ao exercício parece ser modulada negativamente na presença do estrogênio. Quando animais ovariectomizadas (OVX) foram submetidas à exercício, apresentaram maiores níveis de HSP70 muscular do que os indivíduos tratados com o esteroide (Koot et al., 1991; Mendelsohn and Karas, 1999; Paroo et al., 2002)

Com a continua redução na produção hormonal característica do processo de falência ovariana, a citoproteção exercida pelo estrogênio como regente de uma possível resposta anti-inflamatória do sistema cardiocirculatório durante o envelhecimento do organismo passa a ser ameaçada com a menopausa. A partir da capacidade reduzida de produção hormonal, especialmente E2, dois importantes estudos epidemiológicos sugerem que esta cardioproteção ocorra apenas no período anterior à menopausa. O risco cardiovascular das mulheres aumenta ao passo que, por exemplo, a taxa de eventos ateroscleróticos iguala-se à dos homens na mesma idade, o que sugere um efeito de vasoprotetor do estrogênio durante a pré-menopausa. Porém, não existem evidências de que a terapia de reposição hormonal (TRH), seja capaz de reestabelecer a resistência as DCV (WHI, 2002; Hulley et al., 2002).

Torna-se razoável pensarmos que a capacidade de adaptação do organismo, em nível metabólico, não se esgote *in loco*. Diante da ausência hormonal de estrogênio, decorrente da menopausa, o que objetivamente, fragiliza completamente o arranjo anti-inflamatório vascular, pensemos em qual

solução seria possível para a célula endotelial, no mínimo, manter uma de suas principais defesas? Seria a expressão de HSP70 no endotélio vascular e/ou no SNC o parâmetro para desencadear um episódio de fogacho?

A menopausa e suas adaptações

O aumento contundente da expectativa de vida da população mundial de ambos os sexos permite prever que a população feminina possa viver cerca de, no mínimo, um terço de suas vidas no período pós menopausa (Christensen et al., 2009). Na última década do século XX havia mais de 450 milhões de mulheres com idade igual ou superior a 50 anos. Para o ano de 2030, a estimativa é que este grupo ultrapasse 1.2 bilhão de mulheres (Hill, 1996). A menopausa (do grego: *men-* (mês), *-pausis* (parada/interrupção)) apresenta quadro clínico definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a ausência permanente da menstruação, dentro de um intervalo não inferior a 12 meses de amenorreia, consequência da perda da função folicular ovariana não patológica ou da retirada cirúrgica dos ovários (WHO, 1996), associada a níveis plasmáticos de FSH superiores à 40 IU/L (Sowers et al., 2008).

Considerada como o final da vida fértil da mulher, a menopausa natural ocorre em média aos 50 anos de idade (WHO, 1996). É um processo transitório lento, raramente ocorre de forma súbita, compreende um intervalo médio de 2 à 8 anos, denominado climatério ou transição menopáusica (Soules et al., 2001). Este período pode apresentar sinais e sintomas, isolados ou concomitantes, capazes de interferir diretamente no estilo e qualidade de vida das mulheres, além de aumentar o risco de desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas, como Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares (DCV), osteoporose e câncer (WHI, 2002; Hulley et al., 2002; NAMS, 2004; Bosworth et al., 2001; Dennerstein et al., 2000).

Na lista de fatores relacionados ao *status* metabólico menopáusico encontram-se os sintomas *vasomotores*: fogachos, suores noturnos e palpitações; sintomas *urogenitais*: incontinência e infecção do trato urinário, atrofia e ressecamento vaginal; e sintomas *psicocognitivos*: perda da memória, dificuldade de concentração, transtorno de humor, distúrbio do sono, depressão e ansiedade. Susceptível ao surgimento destes eventos fisiológicos e fisiopatológicos, o corpo humano feminino produz um novo cenário orgânico complexo, em desequilíbrio. Resta ainda a possibilidade do ressecamento capilar, perda da flexibilidade da pele, diminuição da libido, dores musculoesqueléticas e fadiga (Daley et al., 2006; Bernis and Reher, 2007; Utain, 2005). Embora esta transição pertença ao conjunto de processos naturais do envelhecimento do organismo feminino, tais alterações apresentam um grande número de disfunções celulares, *a priori*, lideradas pela diminuição nos níveis de estrogênio.

Os sintomas vasomotores, assim denominados, por sua reatividade vascular, com modulação inicial via vasodilatação seguida de vasoconstrição, são considerados os mais presentes problemas da transição menopáusica (Politi et al., 2008). Dentre eles, os fogachos são as principais causas de queixa das mulheres nos relatos clínicos, bem como, é o foco primário de intervenção para a melhoria do bem estar e qualidade de vida das mulheres na menopausa.

Os fogachos são definidos como uma resposta rápida, súbita e exagerada de dissipação de calor, consistindo de sudorese abundante, vasodilatação periférica e sensação de calor interno intenso. *A priori* tal definição se aplica perfeitamente a um conceito de choque térmico, devido a suas características de aparição e intensidade. São acompanhados ainda por pequenas elevações

da temperatura corporal, modulada dentro de uma zona de termoneutralidade muito reduzida (entre 0,0 e 0,4 °C) (Freedman, 2014)

De forma introdutória, pensemos: tendo em vista que o calor, classicamente é indutor de HSP70, e que os estrogênios, por sua vez, também induzem HSP70, logo, surgiu a hipótese de que, na ausência de estrogênios, o hipotálamo pudesse subir a temperatura corpórea no sentido de restabelecer a expressão HSP70 e, conseqüentemente, proporcionar uma resposta anti-inflamatória centrada na HSP70.

Proteínas de Choque Térmico e o Fogacho Menopáusico

Considerado um evento fisiopatológico, ainda com gênese desconhecida, o fogacho é o sintoma mais comum presente em mulheres ocidentais na transição menopáusica. Nos relatos clínicos, são descritos como sensações térmicas extremas de calor, sudorese e calafrios. São referidas as partes superiores do corpo, como tórax superior, pescoço e cabeça (Freeman et al., 2007). Estas regiões corporais são colocadas com leitos vasculares centrais, como a raiz da aorta, carótidas e toda a vasculatura cerebral. Em países desenvolvidos, a taxa de experiência diária de fogachos em mulheres no climatério se aproxima de 90%, e um terço destas com mais de 10 episódios por dia (Freedman, 2014).

Da forma como se apresenta, esse conjunto de efeitos associadas a presença/ausência de estrogênios, nos leva a acreditar que o organismo de mulheres na pós-menopausa esteja respondendo, a partir destes sintomas, a fim de prevenir patologias ósseas e vasculares associadas com o envelhecimento. De fato, os fogachos estão presentes na maioria das mulheres pós-menopausa, e a reposição de estrogênio, praticamente, elimina os sintomas vasomotores. Porém a redução dos estrogênios (falência ovariana), de forma isolada, não explica os surgimentos dos fogachos (Askel et al., 1976). Sabe-se que não existe diferença significativa nos níveis plasmáticos de estradiol entre mulheres com experiência de fogachos e as assintomáticas. Porém, um estudo mostrou que mulheres sintomáticas para fogacho, apresentam menor valor do hormônio e conseqüentemente respondem com um maior número de eventos (Erlík et al., 1982).

As consequências deste aumento do número de fogachos, sugerida como hormônio dependente, segue desconhecida. Acreditamos que outras modificações hormonais, com reflexo no endotélio, possam influenciar de forma sinérgica, porém de maneira secundária o metabolismo vascular. Existe, por exemplo, uma relação entre episódios de fogacho e pulsos de hormônio luteinizante (LH) (Casper et al., 1979; Tataryn et al., 1979). Porém em diferentes situações esta relação desaparece. Mulheres com deficiência de gonadotrofinas apresentam fogacho, mas não demonstram pulsos de LH e mulheres com quadro de amenorreia hipotalâmica produzem pulsos de LH, mas não tem episódios de fogacho (Gambone et al., 1984)

Acreditamos que a relação fogacho/estrogênio tenha consequências específicas na resposta inflamatória do sistema cardiovascular. O endotélio vascular apresenta características multifuncionais a partir de um complexo sistema produtor/modulador de substâncias vasoativas. É um órgão simultaneamente ativo, de forma autócrina e parácrina, com a capacidade para autorregular sua contratilidade e fluidez sanguínea para a manutenção da homeostase circulatória (Tuomikoski et al., 2009). O tecido endotelial atua na regulação da atividade plaquetária, com consequentes efeitos na resposta inflamatória. Com papel central na manutenção do equilíbrio celular, a produção de óxido nítrico (NO) e suas biointerações tem implicações diretas na suscetibilidade à DCV (Arnal et al., 2004).

O estresse oxidativo é um estado celular/metabólico (transitório) decorrente do desequilíbrio ((des)balanço) entre os elementos oxidantes e antioxidantes, a favor dos elementos oxidantes, os quais, potencialmente podem provocar prejuízo ao organismo (Sies, 1997; Halliwell, 2007). Neste sentido, a

produção excessiva e/ou a depleção significativa destas espécies reativa (e.g. óxido nítrico – NO), no endotélio vascular, resultado da alteração do *status redox* celular basal, leva a uma sobrecarga dos sistemas de defesa antioxidantes, criando um ambiente desfavorável, fisiologicamente, o qual está relacionado com a fisiopatologia de inúmeras doenças (Rochette et al., 2013) como o câncer (Beevi et al., 2004; Gecit et al., 2012), aterosclerose e insuficiência cardíaca (Singh et al, 1995) e infarto do miocárdio (Ramond et al, 2013; Dean et al, 2011), hipertensão portal (Moreira et al, 2004), cirrose hepática (Ferrari et al, 2012), autismo (James et al, 2004), doenças de Parkinson e Alzheimer (Valko et al, 2007) e síndrome da fadiga crônica (Kennedy et al, 2005), o que reforça a papel integrador do hormônio esteroide (E2) na promoção da homeostase dos sistemas nervoso central, cardiovascular e muscular.

A fim de agir contra os danos ligados ao desequilíbrio redox os animais possuem sistemas de defesa antioxidantes para a manutenção do meio interno (*milieu intérieur*), composto por antioxidantes enzimáticos divididos em três categorias: superóxido dismutases (SOD), catalases (CAT) e as peroxidases (Px) (por favor, veja (Klandorf & Van Dyke, 2012) para revisão). Porém, quando estas defesas se tornam insuficientes, ocorrendo o dano oxidativo, temos, dentre outros, a peroxidação de lipídeos de membrana (Scandalios, 2005). Um dos produtos desta peroxidação, o malondialdeído (MDA), pode ser usado como um marcador de estresse oxidativo importante por apresentar relação altamente significativa com a presença de DCV (e.g. aterosclerose), porém com um efeito independente do nível de NO (Soydinç et al., 2007)

O estresse oxidativo é um importante modulador clássico na indução de HSP70. Por sua vez, a produção de óxido nítrico, a partir da eNOS (NOS2),

produz uma alça de *feedback* negativo para a expressão de HSP70 (Malyshev et al., 2000). Estudos em diferentes tipos celulares, incluindo células do sistema imunológico, sugerem que o acoplamento eNOS/HSP70 deve ser modulado por estrogênios, em vias predominantemente anti-inflamatórias e anti-apoptóticas (por favor, veja (Karpuzoglu & Ahmed, 2006), para revisão).

O óxido nítrico (NO) participa de vários eventos de sinalização e comunicação celular no endotélio saudável. É capaz de inibir o processo de agregação plaquetária, adesão de monócitos, expressão de moléculas de adesão, além de impedir a proliferação de células musculares lisas para o consequente espessamento da parede vascular. Coincidentemente, este conjunto de respostas desencadeadas por esta espécie nitrosativa determina o desenvolvimento e a progressão da lesão aterosclerótica (Pockley et al., 2009). Neste mesmo endotélio, E2 é capaz de induzir vaso dilatação, via produção local de NO. Esta secreção de NO, a qual leva a inibição da ativação plaquetária, ocorre em um mecanismo dependente de guanosina 3', 5'-monofosfato cíclica (cGMP) (Sharron et al., 2010). Em cultura de células endoteliais, E2 potencializa a liberação de NO em poucos minutos sem alterar a expressão de eNOS. E2 promove a ativação da eNOS através de duas fases concomitantes, via MAPK e PI3K/Akt o que acarreta no aumento da liberação de NO. A proteção do miocárdio através de altas doses de corticoesteroides durante um evento de isquemia/reperfusão (I-R) parece ser mediada pela ação integrada de PI3K/Akt. (Benjamin and McMillan, 1998) Em ambos os casos, ER α e receptores de glicocorticoides ativam PI3K pela associação com sua subunidade reguladora p85 α na condição de ligante dependente. Posteriormente, HSP90 interage com ambos, eNOS e Akt e modula a atividade da eNOS por atuar como um apoiador

na fosforilação dependente de Akt da eNOS (Russell et al., 2000; Takahashi and Mendelsohn, 2003; Chen and Meyrick, 2004). Dado que a interação entre a HSP90 e receptores hormonais é um elemento chave na ativação hormônio dependente de HSF-1 (Knowlton and Sun, 2001), e o produto transcricional resultante desta ativação pode ser outras famílias de HSPs (e.g. HSP70).

Está bem estabelecido que agentes estressores causam a regulação positiva de proteínas de choque térmico (HSP) (Benjamin and McMillan, 1998). Para que isso aconteça, existe a necessidade da presença de diferentes substratos no ambiente celular, como outras chaperonas que atuam de modo a impedir a agregação proteica e ajudar a garantir a correta conformação da estrutura da proteína, bem como garantir a translocação de proteínas danificadas (Storti et al., 2003). Estudos apontam que exista, durante o processo de envelhecimento, o acúmulo de proteínas danificadas ou desdobradas que são capazes de gerar uma sobrecarga para manutenção da proteostase no endotélio vascular. A redução de HSPs com o envelhecimento é fator fundamental para que esta disfunção se inicie. Como função primária, e mais relevante, das proteínas de choque térmico, a proteção do ambiente intracelular contra a ação de proteínas malformadas e a modulação (ativação/desativação) de outras proteínas (complexos enzimáticos e fatores de transcrição). Porém, a redução, de forma objetiva, do *pool* proteico relacionada com a idade certamente reduz as defesas constitutivas da célula (Balch et al., 2008; Swindell et al., 2009). Este conjunto de evidências suporta a hipótese de que exista alguma resposta fisiológica natural para compensar este desequilíbrio. Uma vez que o estradiol atua como maestro de todo ambiente homeostático do vaso até a menopausa, resta saber o que naturalmente o substitui (Figura 1).

Neste sentido, a modulação NF- κ B entra na lista de evidência como elemento chave na resposta/potencialização do processo inflamatório na ausência de estrogênio, pós menopausa (Figura 2). Estudos revelam que, tanto durante o processo de envelhecimento, o aparelho cardiovascular, em ambos os sexos, apresentam aumento da resposta apoptótica e inflamação, bem como alterações significativas na sinalização NF- κ B relacionadas à idade (Borras et al., 2005). Existem evidências de que a relação entre o estrogênio e NF κ B leva à indução de HSF1. Com isso, o estradiol pode inibir atividade de NF- κ B via produção de HSP70 (Meldrum et al., 2005). Ao passo que o estrogênio, via seu receptor (subtipo β - ER β) bloqueia a subunidade p65 do fator de transcrição, e ainda induz a transcrição de I κ B α , criando uma alça de supressão, enquanto houver estrogênio disponível. Neste sentido, cabe pensar que episódios de fogacho podem induzir a produção de HSP70 (Figura 3), a partir de um choque térmico metabólico no leito vascular, a fim de expressar não só HSP70, mas também HSF1 para reestabelecer o controle homeostático anti-inflamatório regido pelo estrogênio em mulheres em idade pré-menopausa.

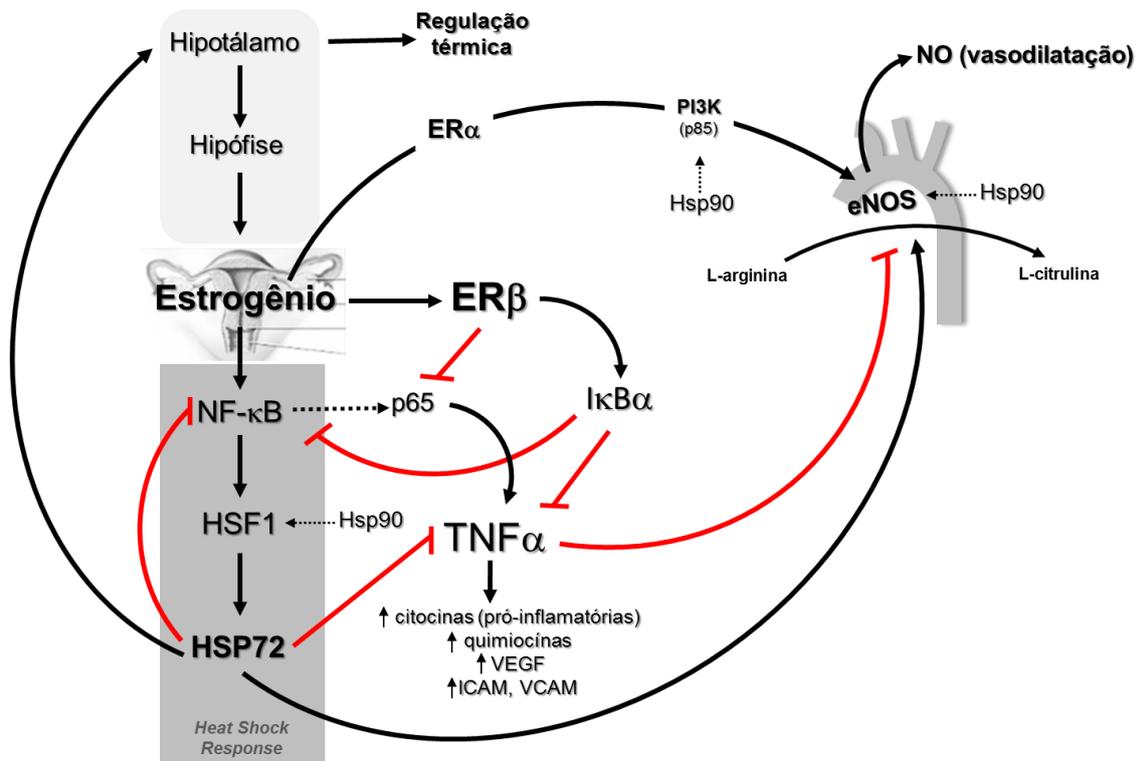


Figura 1. A hipótese Fogacho/HSP70. No período pré-menopausa, a estrutura do eixo hipotálamo-hipófise-ovários (HHOv) está preservada. A partir da produção normal de estrogênio (E2) pelos ovários, ocorre a indução de HSP70, via HSR (*Heat Shock Response*), mediada pela ativação de NF- κ B que induz a expressão de HSF1. HSP70 atua como elemento chave no mecanismo de *feedback* positivo sobre o hipotálamo, modulando a resposta anti-inflamatória de estradiol. E2, via ER α , induz a síntese da eNOS nos vasos, pela ativação da subunidade p85 do PI3K, em especial no arco aórtico. eNOS produz NO pela conversão de L-arginina em L-citrulina. O estrogênio, ainda potencializa a ação inibidora de I κ B α sobre a atividade de TNF α e NF- κ B. Em contrapartida, a subunidade p65 de NF- κ B ativa TNF α , que leva a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (DNA). HSP72 é capaz de inibir tanto NF- κ B, quanto TNF α , exercendo suas propriedades anti-inflamatórias, também induz a expressão de eNOS no endotélio vascular. TNF α atua como inibidor de eNOS, diminuindo a contratilidade do vaso (mecanismo inflamatório). HSF1, eNOS e ER α são coativados na presença de HSP90.

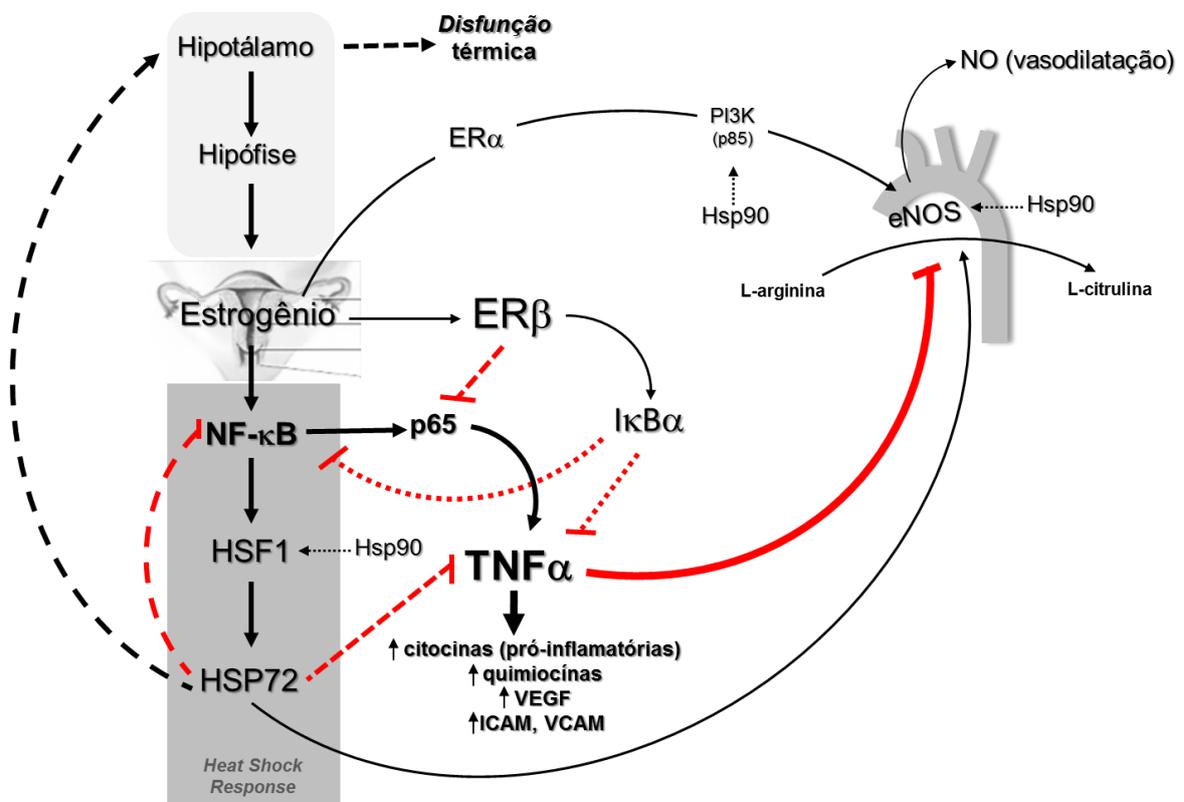


Figura 2. A hipótese Fogacho/HSP70. Durante a transição menopáusic ocorre a diminuição da produção de estrogênio (falência ovariana), que resulta na redução acentuada da capacidade de *Heat Shock Response* do organismo. A redução exacerbada de estrogênio soma-se a diminuição da capacidade do organismo de expressar HSP70, perdendo os recursos inibitórios das vias pró-inflamatórias (NF- κ B e TNF α). Reduz também a indução da síntese de eNOS, via ER α , o que leva ao processo de disfunção endotelial, potencializado pelo aumento da capacidade inibitória de TNF α sobre a enzima vascular, o qual encontra-se com a própria inibição diminuída pelo enfraquecimento da *Heat Shock Response*.

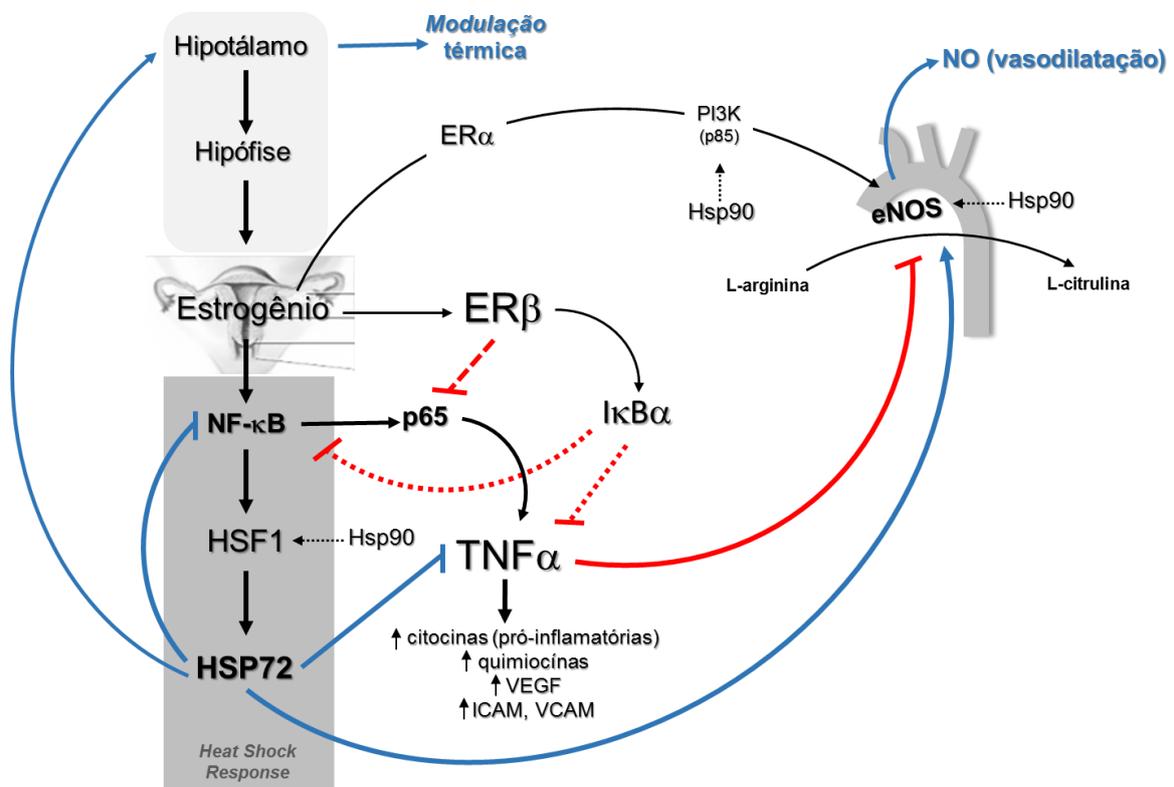


Figura 3. A hipótese Fogacho/HSP70. Com a intervenção através da sessão de choque térmico, ocorrerá uma resposta anti-inflamatória centrada na HSP70, reestabelecendo a capacidade de *Heat Shock Response* do organismo. A partir da expressão aumentada, via choque térmico, de HSP70, ocorrerá a reativação do recurso inibitório das vias pró-inflamatórias (NF- κ B e TNF α). Especialmente no vaso (aorta), ocorreria a recuperação de uma das vias de indução da síntese de eNOS, independente do ER α , o que minimiza, a curto prazo, o processo de disfunção endotelial, pela deficiência de produção de NO e ainda, potencializado pela redução da capacidade inibitória de TNF α sobre a enzima vascular. E ainda, a expressão de HSP70 pode resultar num mecanismo de *feedback* hipotalâmico para a modulação do controle térmico (efeitos do tratamento térmico: conexões azuis).

Outras interações metabólicas são moduladas por estrogênio. A indução de rápidas modificações celulares, em poucos segundos, classificadas como as respostas não genômicas do hormônio (MISS - *membrane initiated steroid signaling*) ocorrem, em sua maioria, desencadeadas a partir de receptores presentes na membrana celular. A rápida sinalização está relacionada com os seus receptores clássicos, α e β , localizados na membrana e citoplasma. Estudos mostraram que tanto HSP70, quanto HSP90 estão presentes neste processo e podem modular esta atividade. Porém, pouco se conhece sobre a relação entre a expressão de HSPs e os receptores de estrogênio, que são ativos independente de ligante (Marino et al., 2006) em ambientes celulares privado de estrogênio. Estudos com inibidores seletivos de ER β foram capazes de reduzir o número de fogachos (Doshi and Agarwal, 2013). Isto colabora com a hipótese de que no meio celular privado de estrogênio, outros elementos, *a priori*, “controlados” pelo hormônio, levem o organismo a desencadear um processo reparador para a falta da molécula central – 17 β -estradiol.

A ativação de diferentes vias de sinalização, estradiol dependentes, no endotélio vascular, ocorrem a partir de proteínas kinase, como as *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPKs), fosfatidilinositol 3 -kinase (PI3K), Proteína kinase C (PKC) e fosfatases. Outros complexos para a produção de metabólitos (biodisponibilidade de aminas cíclicas - cAMP, cGMP) também encontram-se “órfãos” do esteroides. Este grande desarranjo metabólico endotelial irá refletir na disfunção dos processos de modificação pós-translacional de muitas proteínas, especialmente por fosforilação. (Perillo et al., 2000) Como resultado, lembrando a diminuta expressão de chaperonas na menopausa, enzimas serão rapidamente moduladas e defesas celulares, por consequência ficarão reduzidas

(Stice et al., 2011). Desta forma, a função do fogacho de suprir a ausência de estrogênio, levando a indução de HSPs (e.g. HSP70 e HSP90) pela hipótese aqui apresentada, poderia modular receptores de estrogênio localizados na membrana plasmática de células endoteliais. A ação coordenada com as possíveis proteínas fogacho-induzidas poderá manter a atividade de rotas vitais para a célula. Neste sentido, a via de sinalização PI3-K/Akt, através da interação do ER com a subunidade p85 α reguladora da PI3-K, leva *a posteriori* a indução da oxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que é modulada por HSP70. Com isso, ocorre a inibição do processo de apoptose celular pela fosforilação e degradação da proteína pró-apoptótica Bcl-2 (BAD) (Kanda and Watanabe, 2003; Schacter et al., 2014; Ho et al., 2006). Neste contexto, é fundamental a manutenção da produção de óxido nítrico, devido ao importante papel na homeostase vascular, e uma vez que sua produção esteja comprometida, na ausência de estrogênio e HSP70 (ambos reduzidos na menopausa) o NO passa a ser mais um fator a contribuir para a patogênese das DCV, principalmente a aterosclerose e a hipertensão (Boo and Jo, 2003; Nollen and Morimoto, 2002).

Outro mecanismo envolvendo o recrutamento de proteínas reguladoras do ER α (e.g. proteínas de choque térmico) sobre a ligação de E2, agora está prejudicado no ambiente celular pós menopausa e pode levar a ativação da via das MAPKs, através de um novo recrutamento de proteínas moduladoras, pelo ER α , o que leva a sinalização celular via ativação de receptores acoplados a proteína G (Meyer et al., 2014). Como resultado extremo da tentativa do organismo de reestabelecer a regulação primária da proteostase celular, a indução de HSP70, pelo fogacho, tenta manter a resposta inflamatória, liderada por esta chaperona, ao nível de transcrição gênica, através da modulação da

síntese de citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF α . Singh e colaboradores demonstraram que na região promotora do gene para TNF α existe um sítio de ligação para HSF1 que é capaz de reprimir a transcrição de TNF α . Com a perda da via estrogênica indutora de HSF1, o resultado em uma prolongada expressão de TNF α (Pratt and Toft, 2003; George et al., 1998).

Muitos estudos sugerem que HSP70 é fundamental, como um dos elementos chave no mecanismo de defesa vascular, e isso ocorreria diretamente sobre as células endoteliais, com destaque ao potencial papel anti-inflamatório que pode atenuar a aterosclerose (Binder et al., 2002; Hansson, 2002; Homem de Bittencourt et al., 2007).

Contudo, o papel fisiológico dos fogachos pode ser, efetivamente, a indução de HSP70. Os fogachos apresentam relação com alterações no controle da temperatura corporal pelo hipotálamo (Lomax and Schönbaum, 1993), na região de neurônios termossensíveis (Basta et al., 1997). Por outro lado, a expressão de proteínas de choque térmico da família de 70 kDa (HSP70), cuja função está relacionada à proteção intracelular, é dependente da temperatura (Heck et al., 2011). Tanto no SNC (Krebs et al., 1999), como no sistema cardiovascular, incluindo o arco aórtico de ratas ovariectomizadas (Miragem et al. – manuscrito anexo). Sabe-se que o principal fator que afeta a regulação da homeostase endócrina pelo hipotálamo é o envelhecimento (Jones and Boelaert, 2014). Além disso, a expressão de HSP70 no hipotálamo ventromedial é positivamente regulada por estrogênios, sendo que o estradiol influencia a atividade dos receptores de progesterona, andrógenos e de glicocorticoides através da expressão de HSP70 (Maturana et al., 2007). Por isso, não se pode descartar a possibilidade de que, durante o climatério, os episódios de fogacho

possam ocorrer para suprir a queda de temperatura decorrente da redução de estrogênios circulantes, no sentido de restabelecer a correta expressão de HSP70 (que responde a aumentos de temperatura), e que é necessária para o equilíbrio da resposta aos hormônios ovarianos. Haja vista a carência de estudos que abordem os efeitos metabólicos dos fogachos e sua correlação com marcadores fisiológicos (e.g. inflamatórios), bem como a hipótese de possíveis benefícios citoprotetores destes eventos, busca-se explicar em modelos animais (ensaios em andamento em nosso laboratório) o efeito da privação de estrogênios e dos fogachos sobre a expressão e atividade da HSP70, e suas implicações na resposta inflamatória, em especial na aorta.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito agudo do tratamento térmico nos níveis de hsp70 e marcadores de estresse oxidativo, parâmetros hematológicos e controle glicêmico de ratas Wistar (intactas e castradas) e sua possível relação com os sintomas vasomotores do climatério.

Objetivos específicos

Avaliar o efeito do choque térmico em ratas ovariectomizadas:

- a)** na aorta quanto aos níveis de *Heat Shock Protein 70* kDa (iHSP70) intracelular (citoplasmáticos);
- b)** no plasma quanto aos níveis de *Heat Shock Protein 70* kDa (eHSP70) (extracelular);
- c)** no plasma quanto a atividade da superóxido dismutase (SOD);
- d)** no plasma quanto a atividade de enzimas que consomem H₂O₂ (e.g. CAT);
- e)** no plasma quanto aos níveis Malondialdeído (MDA - TBARS);
- f)** no plasma quanto aos parâmetros hematológicos (Hemograma);
- g)** na razão entre HSP70 intra e extracelular ($R=(iHSP70)/(eHSP70)$);
- h)** na resposta glicêmica através do Teste de Tolerância a Glicose intraperitoneal (TTGip).

MATERIAL E MÉTODOS

Delimitação do estudo

Foi realizado um estudo experimental, *in vivo* e prospectivo.

Animais

Foram utilizadas neste estudo, ratas adultas (28 semanas), da linhagem Wistar (total n=38), pesando em média 250 g à 300 g, obtidos no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), órgão auxiliar do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS). Os animais foram mantidos sob condições constantes de temperatura (24 ± 1 °C), com controle automático do fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro; luz acesa às 07 h 00 min), e umidade relativa do ar em 60%. Os animais tiveram acesso a comida (dieta comercial padrão de laboratório (Nuvilab®, Curitiba, Brasil) e água *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

Para os procedimentos cirúrgicos dos animais submetidos a castração foram realizados sob anestesia geral, composta por Ketamina (Vetanarcol, 100 mg/kg) e Xilazina (Kensol, 5 mg/kg). Os demais grupos que não foram ovariectomizados, foram submetidos à falsa operação (*sham operation*) para padronização do estresse cirúrgico nos resultados obtidos. A ovariectomia possui **GRAU DE SEVERIDADE** considerado **MODERADO**, pois se trata de cirurgia sob anestesia geral e analgesia apropriada com sulfato de morfina (Cristália, 5 mg/kg durante 24 h no período pós operatório), e não acarretou prejuízos no bem-estar ou nas condições gerais dos animais, apenas um leve incômodo nos primeiros dias pós operação. Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, todos os animais, foram mantidos em local adequado

composto de aquecimento corporal, com temperatura ambiente levemente elevada, por 24h, com lâmpada incandescente direcionada à caixa. Os animais foram mantidos em sala específica e separada do local do experimento para posterior encaminhamento aos locais de procedimento. Ressalta-se que os animais não sofrem nenhum tipo de desconforto de tal sorte que, conforme amplamente documentado na literatura especializada a respeito deste modelo animal castrado, o **GRAU DE SEVERIDADE** pode ser considerado como **LEVE**.

Detalhamento experimental

Foram utilizadas 25 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) ao longo deste estudo. Os animais foram alocados nos seguintes grupos de acordo com o tratamento (n= 6 para C, HS e HS+OVX, e n=7 para OVX):

G1 – Controle (C);

G2 – Choque Térmico (*Heat Shock* - HS);

G3 – Ovariectomizadas (OVX);

G4 – Ovariectomizadas + Choque Térmico (HS+OVX).

As observações ocorreram de forma contínua ao longo do tempo. Todos os grupos foram submetidos ao Teste de Tolerância à Glicose intraperitoneal (TTGip). Os grupos foram submetidos a choque térmico (*Heat Shock* - HS) (Toslon; Roberts, 2005; Bathaie et al, 2010) ou intervenção cirúrgica para a realização de ovariectomia bilateral (OVX) (Zou, 2011) ou a soma das intervenções (OVX + HS). A intervenção térmica foi realizada na noite imediatamente anterior ao Teste de Tolerância à Glicose intraperitoneal (TTGip), que teve início 12h após o banho de imersão. O grupo G1 (C), foi mantido em banho de imersão igualmente, porém com a temperatura corporal controlada para se manter em 37°C (temperatura basal em repouso), e normalizado para as condições de estresse cirúrgico, quando submetidos a uma cirurgia fictícia (sham operation) e anestesiados no mesmo momento da intervenção térmica dos grupos espelhados. Já o grupo G2 (HS) foi submetido ao protocolo de choque térmico, normalizado para as condições de estresse dos demais grupos, porém com a temperatura da água controlada em 42 °C, para que fosse mantida a

temperatura corporal em 41,2 °C durante 15 minutos. O grupo G3 (OVX), recebeu tratamento idêntico ao G1, porém os animais foram ovariectomizadas 07 dias antes do TTGip. Por fim, o grupo G4 (OVX + HS) recebeu ambos os tratamentos aplicado aos grupos G2 e G3.

Protocolo de castração (ovariectomia bilateral)

Os animais experimentais alocados nos grupos castrados (OVX e HS+OVX) quando alcançaram os 7 meses de idade, foram preparados para o procedimento cirúrgico (ovariectomia), sob efeito da anestesia. Para tanto, após tricotomia da região abdominal lateral, a pele e a musculatura sofreram incisão longitudinal, na região abaixo da última costela e próxima ao nível do rim, em ambos os lados. O ovário foi localizado anatomicamente, identificado e exposto, sendo realizada a hemostasia através da ligação da parte superior da trompa com fio de sutura. O ovário, a gordura circundante, o oviduto e uma pequena porção do útero foram excisados. A musculatura e a pele foram posteriormente suturadas.

Já os animais experimentais alocados nos grupos não castrados (C e HS) quando chegaram à mesma idade foram submetidas à falsa-ovariectomia (*sham operation*). Estes animais tiveram somente seus ovários identificados e expostos cirurgicamente, sendo que, a seguir reposicionados na cavidade abdominal, seguido de sutura da musculatura e pele previamente excisadas, padronizando o estresse cirúrgico para todos os grupos experimentais.

Protocolo de choque térmico (hot tub session)

Os animais foram pesados para o cálculo do volume de anestésico. Sob anestesia de pentobarbital sódico (Syntec, 100 mg/kg), por via intra peritoneal (i.p.), os animais foram preparados com a introdução da sonda retal, a fim de monitorar as alterações térmicas provenientes das trocas de calor entre a massa corporal do animal e o meio aquático do banho. Os animais foram suspensos, via fixação na borda do tanque, pela utilização de suspensório de elástico, ficando apenas com a cabeça para fora da água (Figura 4). A temperatura da água foi mantida constante para que a resposta térmica corporal do animal permaneça em $36^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ para os grupos controle e $41,2^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ para os grupos submetidos ao choque térmico. Quando o animal em choque térmico alcançou a temperatura de 41°C , iniciou-se a contagem dos 15 min do protocolo experimental. Ao final do choque térmico de 15 min, iniciou-se o período de jejum que antecede o TTGip.

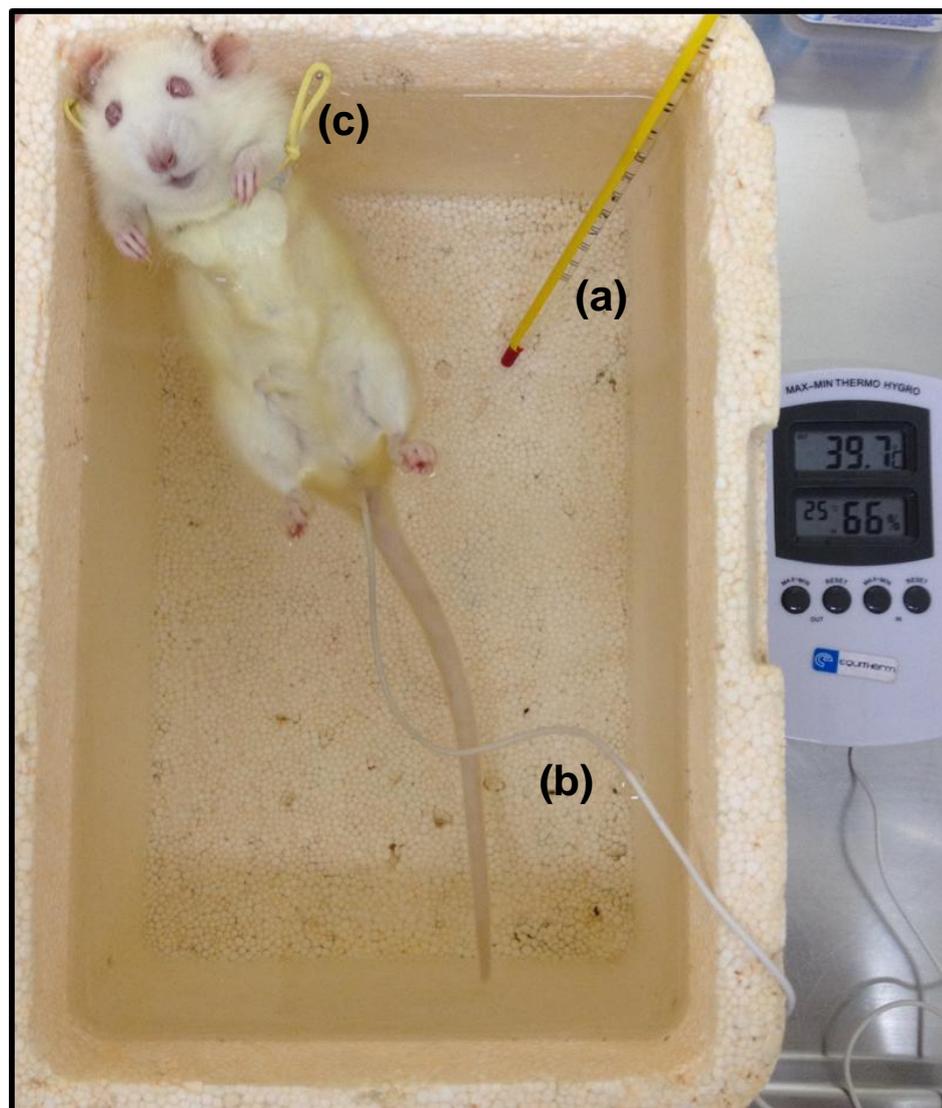


Figura 4. Estrutura para a realização da sessão de choque térmico experimental composta por tanque de isopor com água aquecida de acordo com o tratamento pré-estabelecido (37 °C ou 42 °C), **(a)** termômetro de mercúrio padrão de laboratório, **(b)** sonda retal acoplada a um higrômetro digital e **(c)** suspensório elástico fixado na parede interna do tanque.

Determinação da fase do ciclo estral

No último dia do protocolo experimental (TTGip, seguido de eutanásia), foram colhidos esfregaços vaginais para identificação da fase do ciclo estral das ratas participantes dos grupos experimentais, independente de terem sido submetidas a ovariectomia bilateral. Os esfregaços foram distribuídos em lâminas de vidro, fixados em solução de álcool-éter (1:1), sendo então posteriormente analisados por microscopia de luz, para a determinação da fase do ciclo estral, ou ausência do mesmo, quando aplicável (Shorr, 1941).

Teste de Tolerância à Glicose via Intra Peritoneal (TTGip)

Foi preparada uma a solução de glicose (Sigma G8270, St. Louis - MO) 80% (80g em 100ml ou 800mg em 1ml), a qual foi administrada via intraperitoneal (i. p.) na dose de 1g/kg. Os animais foram submetidos a uma coleta sequencial de sangue a partir de punção caudal, para a verificação da glicemia no Sistema de Monitoramento de Glicemia e Cetonemia *Optium Xceed* – Abbott, US (Figura 5). As coletas sanguíneas ocorrerão imediatamente antes da administração da dose de glicose (T=0) e 30, 60, 90 e 120 min após o início do monitoramento da glicemia para a construção de uma curva glicêmica.



Figura 5. Foto do equipamento utilizado para o monitoramento dos valores glicêmicos de ratas Wistar submetidas ao choque térmico.

Medida da temperatura dos animais

A temperatura corporal dos animais foi verificada através de sonda retal introduzida 7mm após o esfíncter anal. Os animais tiveram suas temperaturas mensuradas imediatamente antes do início do choque térmico (**temperatura basal**), durante todo o período de imersão (**temperatura no banho**), imediatamente após o término do choque térmico (**temperatura final**), bem como, trinta (30) minutos após a saída do banho (**temperatura de recuperação**) para controle do processo de aquecimento corporal sob efeito de anestesia. A temperatura da água foi medida com termômetro de mercúrio padrão de laboratório sendo que não houve, em nenhum experimento, perda de temperatura da água superior a 1°C.



Figura 6. Foto ilustrativa do procedimento de medida da temperatura corporal dos animais submetidos as intervenções previstas no estudo. Medição realizada com termômetro comercial digital, com a ponta embebida em vaselina. Os animais foram mantidos em decúbito lateral, a fim de promover um maior conforto durante o retorno da anestesia.

Métodos de análise

Testes específicos foram realizados para as análises das proteínas envolvidas nos mecanismos metabólicos objeto deste estudo. Para o estudo da expressão das proteínas de choque térmico no arco aórtico foi utilizada a técnica de *Western blot*. A quantificação das eHSP70 foi realizada por ELISA. Para a análise dos níveis de estresse oxidativo plasmático (SOD, CAT e TBARS) foram utilizadas técnicas espectrofotométricas validadas. E para análise do perfil hematológico foi utilizado hemograma padrão estratificado, velocidade de hemossedimentação (VHS) e avaliação da Proteína C Reativa (PCR).

Preparação dos Tecidos

Os animais foram mortos imediatamente após o término do Teste de Tolerância à Glicose intraperitoneal (TTGip), realizado 12 horas após a intervenção terapêutica de choque térmico, com o uso de guilhotina especial para roedores, a fim de coletar os tecidos para análises bioquímicas. O principal tecido analisado (arco aórtico) foi excisado a partir da dissecação da estrutura composta pelo coração, aorta completa e rins, conforme imagem a seguir.

O principal tecido, foco deste estudo, o arco aórtico, foi coletado e metade do conteúdo foi homogeneizado com SDS 0,1% e PMSF, congelados e armazenados para determinar a expressão de HSP70 por *Western blot*.

O sangue do tronco dos animais foi coletado, após decapitação, com heparina e centrifugado a 3000 rpm por 5 min e o plasma foi alíquotado para dosagens de eHSP70. Foram separadas ainda alíquotas de plasma e soro para

a análise de 17β -estradiol, SOD, consumo de H_2O_2 (e.g. CAT), TBARS; e parâmetros hematológicos.

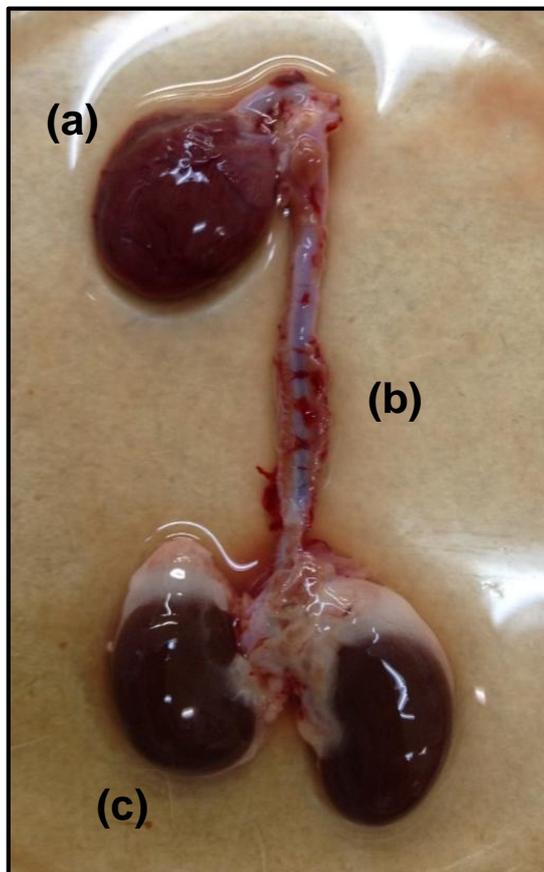


Figura 7. Estrutura anatômica dissecada para a preservação dos segmentos: **(a)** coração, **(b)** aorta e **(c)** rins. A partir da excisão do coração e dos rins a aorta foi fracionada em três porções: arco aórtico, aorta torácica e aorta abdominal/bifurcação das renais.

Dosagem de Proteínas e Teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A concentração de proteína e determinação da peroxidação lipídica nos homogeneizados dos animais foi determinada pelo método espectrofotométrico de *Bradford*, a 595nm, utilizando curva padrão de albumina (Bradford, 1976) e curva padrão de malondialdeído (MDA - 1.1.3.3 - Tetramethoxypropane) com pontos de 0.0005 à 0.016 mg/mL (Buege e Aust, 1978).

A concentração de TBARS formada foi expressa em nmol equivalente de MDA por mg de proteína. Assim, 50 µl de amostra a cerca de 1 mg/ml (aproximadamente 50 µg de proteína) foi colocada em tubo Eppendorf de 1,5 ml com furos na tampa. Após, foi adicionado 200 µl de TCA 30% (agitado por 1 min em vórtex), 200 µl de Tris-HCl (agitado por mais 1 min em vórtex), centrifugado por 10 min a 2500 x g a 4 °C e coletado 440 µl do sobrenadante. Na sequência, foi adicionado ao sobrenadante 200 µl de TBA, 10 µl de hidroxitolueno butilado (BHT) e agitado por alguns segundos. Após este procedimento, o conteúdo foi levado ao banho-maria a 100 °C por 15 min.

Realizou-se a leitura a 535 nm diretamente contra mistura contendo 50 µl de água, 200 µl de TCA, 200 µl de Tris-HCl, 10 µl de BHT e 200 µl de TBA fervido paralelamente. No caso de tecidos sólidos, todos foram homogeneizados com a tesoura em TCA 15% (5 ml por grama de tecido) contendo 15 µl de BHT 29,5 mmol/L (adicionado na hora) para evitar a auto-oxidação de lípidos; fervidos por 30 min, centrifugados e misturados com TBA 1:1; ler a 535 nm.

Determinação da superóxido dismutase (SOD) e consumo de H₂O₂/catalase (CAT) plasmáticas

A análise da atividade de SOD foi realizada técnica de inibição da auto-oxidação do pyrogallol (Marklund and Marklund 1974). Em uma cubeta, 970 µl de tampão Tris 50 mM/EDTA 1 mM (pH 8.2), 4 µl de catalase (CAT; 30 µM) e 10 µl de plasma foram adicionados e misturados. Depois, 16 µl de pyrogallol (24 mM em HCl 10 mM) foi adicionado. Por fim, a atividade de SOD foi determinada em espectrofotômetro (420 nm), a 25 °C por 120 s.

A atividade da Catalase (CAT) foi realizada de acordo com o descrito por Aebi (1984). Em uma cubeta de quartzo, 10 µL de plasma foi misturado a 955 µl de tampão fosfato (50 mM, pH 7.4). Logo após, 35 µl de peróxido de hidrogênio (0.01 M) foi adicionado e a solução novamente misturada. A decomposição de peróxido de hidrogênio via atividade da CAT foi determinada por leitura espectrofotométrica (240nm), a 25 °C por 120 s.

Parâmetros hematológicos - Hemograma

O sangue foi acondicionado em tubo com anticoagulante (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos (5µl de EDTA, para cada 500 µl de sangue). Para a determinação automatizada foi utilizado o analisador hematológico Micros 60 (Bayer), seguindo as recomendações do fabricante. Através desse equipamento é possível obter os seguintes parâmetros: contagem total de hemácias, hematócrito, hemoglobina, índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), amplitude de distribuição dos eritrócitos - RDW; contagem total de leucócitos, contagem relativa e absoluta de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) além da contagem de plaquetas.

As amostras foram diluídas 1:2 com solução salina 90% e realizadas em triplicata. Após, foram realizadas distensões hematológicas em lâmina, corados com coloração panóptica (Newprov) e para cada lâmina uma contagem de 100 células (HORIBA Medical, Fr).

Velocidade de Hemossedimentação (VHS)

Para realização do VHS, as amostras utilizadas foram as mesmas as quais para realização do hemograma. Foram utilizados capilares, preenchidos com sangue e mantidos na vertical para observação da sedimentação por uma hora, medidos por mm (Bedell & Bush, 1985) como indicativo da presença de processos inflamatórios agudos.

Determinação da Proteína C Reativa (PCR)

No início do teste qualitativo, garantiu-se que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente antes do uso. Feito isso, esgotou-se o conteúdo do conta-gotas e agitou-se o PCR Reagente Látex gentilmente. Utilizando uma pipeta automática, para obter resultados mais precisos, fêz-se os seguintes procedimentos:

- a. Colocou-se 20 μ L (uma gota) do PCR Reagente Látex em divisões separadas da placa, para amostras a serem testadas, bem como para os controles positivos e negativo.
- b. Adicionou-se 20 μ L de cada amostra não diluída e de cada controle não diluído.
- c. Misturou-se, com auxílio do bastão descartável, estendendo o líquido igualmente sobre cada divisão da placa, utilizando bastões diferentes para cada amostra.
- d. Agitou-se a placa com suaves movimentos de rotação em agitador automático a 100 rpm durante 2 minutos, e observou-se a aglutinação sob luz incidente.
- e. Apontou-se os resultados.

Após os procedimentos realizados, examinou-se macroscopicamente a presença ou ausência de aglutinação após 2 minutos. A presença de aglutinação indicou o conteúdo de Proteína C Reativa no soro igual ou superior a 6mg/L (Schalla et al., 1984).

Expressão de HSP70

Foi analisada a expressão de HSP70 em homogeneizados de aorta por Western Blotting, eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970), com o uso de anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147) diluído 1:1000, com segundo anticorpo contendo peroxidase (Sigma A9044) diluído 1:10.000. A técnica é composta pela verificação da expressão das proteínas por meio da separação por eletroforese desnaturante de quantidades idênticas de proteínas carregadas em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). De cada homogeneizado tecidual foi realizado a dosagem de proteína pelo método de Bradford (Bradford, 1976), homogeneizadas novamente (a uma razão mínima de 1:1) com tampão para eletroforese (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 minutos para desnaturação completa das proteínas. Quantidades iguais de proteína (~40µg por poço) foram aplicadas no gel, para separação durante 4 h utilizando corrente elétrica constante a 15 mA por gel. Foi utilizado o sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean TetraCell (BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA, USA) preenchido com tampão contendo Tris a 25 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3. Foi usado gel de entrada (empilhamento) a 4% e gel de separação a 10% (em termos de monômeros de acrilamida). Foi usado como marcador de peso molecular 5 µL de mistura de proteínas recombinantes pré-coloridas (RPN800E, GE Health Care) por gel.

Depois da separação pela corrida em gel de poliacrilamida, a porção referente ao gel de entrada foi descartada e a porção referente ao gel de separação foi submetida a eletrotransferência. Neste procedimento foi utilizado o sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100V constantes por 2 h para

promover a transferências das proteínas e padrões coloridos do gel para uma membrana de nitrocelulose (GE Health Care-Amersham). A confirmação do sucesso dos procedimentos descritos acima foi dado 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%). Após este procedimento, as membranas foram descoradas com solução TEN (Tris-EDTA-NaCl a respectivamente 50, 5 e 150 mM) - Tween 0,1% (v/v). Os procedimento de imunoblotting (*Western blots*) foram realizados em aparelho específico com uso de sistema de vácuo (SNAP i.d., MilliPore), otimizando o tempo de reação dos anticorpos sendo: Incubação instantânea a vácuo com tampão de bloqueio (leite em pó desnatado a 0,5% em TEN-Tween 0,1%); incubação por 10 minutos com anticorpo específico (diluído 1:1000 em TEN-Tween 0,1%); Três lavagens instantâneas a vácuo com 15 mL TEN-Tween 0,1%; Incubação por 10 minutos com segundo anticorpo conjugado com peroxidase HRP (Sigma A9044, Anti19 IgG (molécula inteira) de ratos, a uma diluição de 1:10000 em TEN-Tween 0,1%; Três lavagens instantâneas a vácuo com 15 mL TEN-Tween 0,1%. A imunodeteção foi realizada por quimiluminescência com uso de Luminol, ácido p-coumárico e H₂O₂, sendo a quimiluminescência fotodocumentada (60 fotos, 1foto/10seg) em sistema automático e motorizado ImageQuant 350 (GE Health Care). A análise do conteúdo celular de β -Actina foi usado como normalizador, utilizando os mesmos métodos e instrumentos para a incubação com anticorpo anti β -actina contendo peroxidase (Sigma A3854, 1:1000).

Dosagem de HSP70 em plasma (eHSP70)

Para a dosagem do conteúdo de eHSP70 foi utilizado o kit comercial para ELISA em soro e plasma (HSP70 high sensitivity ELISA kit - ADI-EKS-715, Enzo LifeScience/Stressgen Biothechnologies). A partir do sangue total, coletado em tubos com EDTA, as amostras ficaram em repouso por 30 minutos. Após este período, centrifugou-se a 1000 x g durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi dividido em alíquotas e armazenado a - 20 ° C, exceto o utilizado imediatamente no ensaio. Para o procedimento de análise foi adicionado 100 µl do tampão de ensaio para S0 = 0 ng/ml de padrão, no poço indicado. Logo após adicionou-se a curva de padrões fornecida pelo fabricante dos pontos #1 ao #7, em duplicata. Ao término da curva, colocou-se as amostras, e a partir da placa completa, realizou-se o selamento da placa com adesivo próprio para o ensaio. Deixou-se incubar por 2 horas em agitador horizontal (tipo orbital). Após a adição de 400 µL de tampão de lavagem, repetiu-se 4 vezes esta etapa do ensaio. Após a lavagem final, e após a aspiração dos poços, bateu-se firmemente a placa numa toalha de papel sem fiapos para remover qualquer tampão de lavagem restante. Em seguida, adicionou-se 100 µL do primeiro anticorpo em cada poço, exceto no branco (S0), e incubou-se por mais 1 hora. Em seguida colocou-se o conjugado com o segundo anticorpo e incubou-se por mais 1 hora. Entre cada troca de substrato realizou-se os mesmos procedimentos de lavagens e selamento da placa para incubação sob agitação. Ao final realizou-se a quantificação na leitora de ELISA. Os resultados foram expressos em ng/mL (média ± D.P.M.).

Dosagem de 17 β -estradiol

Para utilização do diagnóstico *in vitro* na determinação quantitativa de 17 β -estradiol (E2) no soro ou plasma (com heparina ou com EDTA) foi utilizado o sistema ADVIA Centaur XP (Siemens Healthcare Diagnostics. Tarrytown NY, USA).

O ensaio ADVIA Centaur XP E2 é um imunoenensaio quimioluminescente e utiliza um formato de ensaio competitivo, com sensibilidade e limites do ensaio entre 11,8 e 3.000 pg/mL (43,6–11.010 pmol/l). Todos os procedimentos foram realizados na Unidade de Ensino e Pesquisa do Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Cálculo do tamanho amostral

O tamanho amostral foi de 25 animais no total, os quais foram utilizados para o estudo da expressão proteica de HSP70 e os níveis plasmáticos de eHSP70, SOD, CAT, TBARS, 17 β -estradiol e parâmetros hematológicos. Para este estudo foi calculado um tamanho amostral ($n=6$ /grupo) para detectar a menor diferença esperada entre os grupos para a principal variável dependente do estudo, expressão de HSP70 (Paroo et al, 2002). Foi utilizado para o cálculo um poder estatístico de 80% para um nível de significância de 0,05% e o software de Dimensionamento Amostral DIMAM 1.0 para Windows da Editora Guanabara Koogan.

Análise estatística

O tratamento estatístico foi realizado por procedimentos descritivos (medidas de tendência central e dispersão) e inferenciais: Análise de Variância de uma via – ANOVA (one way). Teste de Levene foi utilizado para detectar desvios a partir homocedasticidade entre os grupos testados. Quando ANOVA (one way) detectou diferenças estatisticamente significativas, sempre que os valores de p foram inferiores a 0,05, as comparações foram identificadas pelo procedimento de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad InStat 3.0 para Windows.

Aspectos éticos e de biossegurança

Todos os procedimentos realizados neste estudo, envolvendo animais estão de acordo com as diretrizes éticas previstas na Lei Arouca (Lei Federal 11.794/2008) e o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* (publicação NIH nº 85-23, revisão em 1996). Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA #19858), e pelo Grupo de Pesquisa e Pós Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA #11/0665), em conformidade com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Após cada período experimental e respectivos tratamentos, os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores sem anestesia, para coleta do sangue (3,5 mL no momento da decapitação) e obtenção dos tecidos, para a posterior realização das análises. Os animais foram mortos em sala com exaustão apropriada e especialmente designada para esta finalidade. Entre a morte de um animal e outro, todo o equipamento e material cirúrgico foi completamente higienizado com água e detergente de maneira a minimizar-se o estresse que pudesse vir causar ao próximo animal a ser morto.

O método escolhido para eutanásia baseia-se no fato deste ser um método eficaz, que induz a perda imediata de reflexos, além de produzir mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos. Considerando a necessidade de obtenção de sangue periférico e realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância será injetado nos animais por ocasião da decapitação e o **GRAU DE SEVERIDADE** para este procedimento é considerado como **SEM RECUPERAÇÃO**. A morte dos animais sob anestesia,

apesar de desejável, é incompatível com nossos experimentos porque todos os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores (Brown et al., 2005; Saha et al., 2005). Além disso, esses anestésicos interferem em diferentes funções das células, como a produção de proteínas de choque térmico (Chang et al., 2005), cuja expressão bloqueia a indução da iNOS, uma das principais rotas investigadas neste estudo.

Após os experimentos, restos de tecidos e carcaças dos animais foram congelados e entregues ao serviço de coleta especializado da Universidade. Resíduos de géis de poliacrilamida, agarose (contendo brometo de etídio), flaconetes contendo líquido de cintilação à base de tolueno (mesmo que com material radioativo), quando gerados, são tratados como Lixo Químico que é coletado pelo serviço de coleta sediado no Instituto de Química da UFRGS.

Todos os procedimentos realizados neste estudo se encontram em consonância com a legislação vigente, seguindo rigorosamente as orientações da Resolução da Diretoria Colegiada – **RDC nº 306**, de 07 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que dita sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde (RSS) no que tange, principalmente, o manejo através da segregação, acondicionamento, identificação, transporte interno, armazenamento temporário, tratamento, armazenamento externo, coleta e transporte externos adequados.

Equipamentos de biossegurança

Cabines de fluxo laminar vertical; autoclaves e fornos de esterilização, chuveiro de segurança com dispositivo para lavagem de olhos encontra-se no corredor de acesso ao Laboratório. Todo pessoal envolvido nos procedimentos utilizou avental padronizado do laboratório, luvas, pró-pés e óculos de proteção, quando estes dois últimos itens são obrigatórios às atividades laboratoriais.

Licenças especiais

O FisCel possui licença (CQB) de funcionamento junto à Comissão Técnica Nacional de Biotecnologia (CTNBio) para operação em ambiente NB-2 com OGMs do tipo II. Para operação com materiais radioativos, quando necessário, o FisCel possui matrícula vigente junto à Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e os usuários envolvidos com o uso de radioisótopos são cadastrados e possuem licenças pessoais em vigor.

RESULTADOS

O estudo em modelos animais exerce papel fundamental para a compreensão dos mecanismos fisiológicos adaptativos do organismo para a manutenção da vida. O presente estudo teve como foco principal o entendimento da expressão da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) em um ambiente privado de hormônios estrogênicos, e em um organismo naturalmente envelhecido. Para tanto, coube caracterizar a resposta da temperatura corporal (T_c) ao choque térmico dos grupos experimentais submetidos ao banho de imersão nas diferentes temperaturas do protocolo de choque térmico.

Todos os grupos experimentais apresentaram, em repouso, temperatura média equivalente e compatível com a temperatura basal do modelo animal escolhido, que é de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os grupos *Heat Shock* e *Heat Shock + OVX* ficaram imersos durante 15 minutos, a contar do momento em que a temperatura corporal atingiu $41,2^{\circ}\text{C}$, em água mantida a 42°C . As animais controles e ovariectomizadas ficaram em imersão pelo mesmo período, com a temperatura corporal média controlada em $37^{\circ}\text{C} \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ em água mantida a 36°C . Já no período de recuperação, a temperatura corporal foi aferida 30 minutos após o término do banho. Todos os grupos apresentaram, em média, $34,9^{\circ}\text{C}$, conforme mostrado na figura 8.

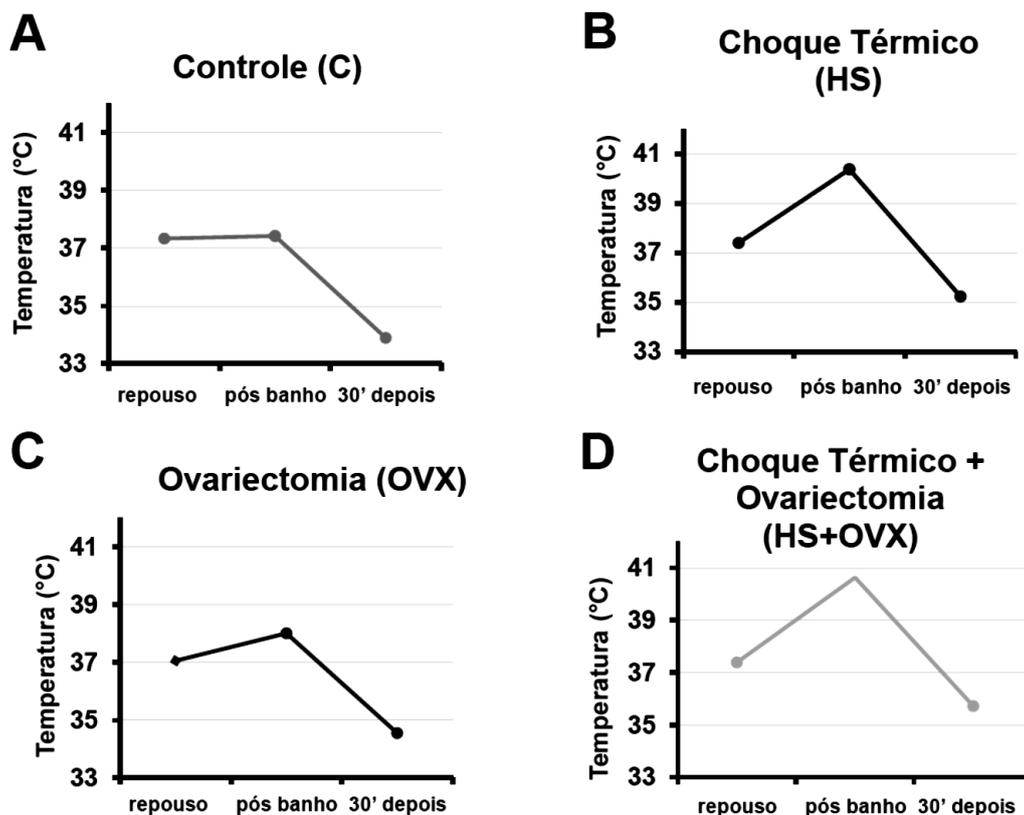


Figura 8. Gráficos das temperaturas corporais médias dos animais submetidos ao banho de imersão à 36°C **(A)** grupo controle e **(C)** grupo ovariectomia; banho de imersão à 42°C **(B)** grupo choque térmico e **(D)** grupo choque térmico + ovariectomia, com $n = 6$ para os grupos C, HS e HS+OVX; $n = 7$ para o grupo OVX. As medidas foram realizadas em três momentos diferentes: em repouso - imediatamente antes do início do banho; ao final do banho - imediatamente após a saída do banho; 30 minutos após a saída do banho.

A avaliação do peso corporal dos grupos experimentais foi de fundamental importância, uma vez que, todas as intervenções propostas neste trabalho poderiam interferir metabolicamente na manutenção da massa corporal dos animais. O procedimento cirúrgico para a castração, associado ao período de *washout* hormonal de 1 semana, e o próprio choque térmico, seguido de jejum de 12h influenciaram uma modesta redução de peso nos animais durante este intervalo do período experimental. Todos os grupos apresentaram diminuição da massa corporal total no intervalo entre a ovariectomia e o TTGip, sendo que o grupo ovariectomizado (OVX) apresentou redução de 6,5%, enquanto que o grupo submetido apenas ao choque térmico (HS) demonstrou redução de 3,1%. Já os grupos controle (C) e ovariectomizado submetido ao choque térmico (HS+OVX) tiveram uma diminuição de 4,6% e 4,5%, respectivamente (Figura 9).

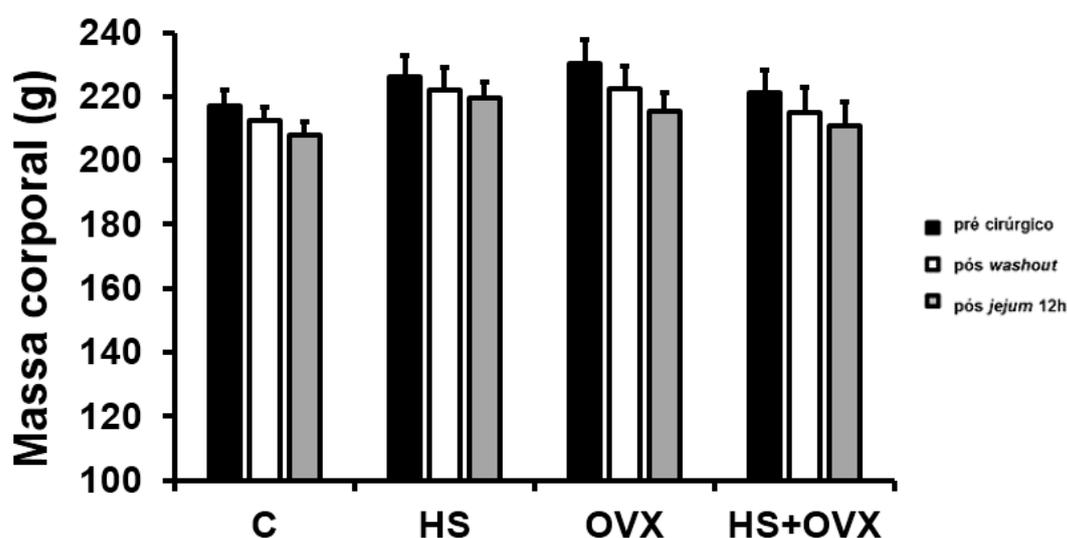


Figura 9. Peso corporal médio dos grupos experimentais no momento pré-cirúrgico para ovariectomia bilateral ou *sham operation* (barras pretas); pós *washout* hormonal (barras brancas); e pós jejum de 12h, imediatamente antes do início do TTGip (barras cinzas), com $n = 6$ para os grupos C, HS e HS+OVX; $n = 7$ para o grupo OVX.

A avaliação do ciclo estral das animais foi realizada imediatamente antes o início do TTGip, através da análise das imagens de lâminas histológicas de esfregaço vaginal, coradas pelo método Shorr (Shorr, 1941). É consenso que modelos experimentais de ratas (Wistar) permitem as inferências metabólicas hormonais relacionadas ao ciclo ovulatório de forma muito semelhante as humanas. As ratas como são animais do tipo poliestro, apresentam ovulação espontânea e ciclos sucessivos que variam com a idade. Assim, realizou-se a avaliação da fase do ciclo estral de todos os animais experimentados, independente da castração, para verificar a efetividade, em nível uterino, da castração. Todas as ratas não castradas (100%) foram encontradas na fase de estro (Figura 10) e as castradas foram consideradas acíclicas, por não apresentarem tipos celulares para a caracterização do ciclo, conforme o esperado.

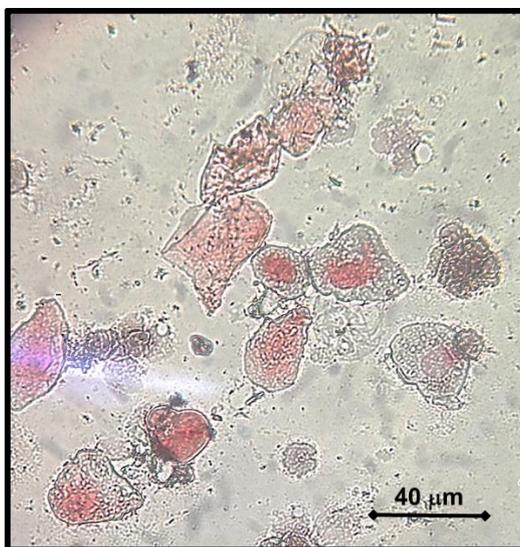


Figura 10. Imagem representativa de esfregaço vaginal, coradas pelo método Shorr (Shorr, 1941), imediatamente antes do TTGip. Identificação da fase do ciclo estral, durante o período principal (semana da intervenção) dos animais do experimento. A fase de estro, representada pelos aglomerados de células acidófilas enucleadas que são observados.

Doze horas após a sessão de choque térmico, os animais foram mortos por decapitação, em guilhotina para roedores, e os tecidos de interesse foram dissecados. Foi realizada a medida da expressão de iHSP70 no arco aórtico dos animais pela técnica de *Western Blot* (Figura 11). A expressão de HSP70 no arco aórtico dos animais submetidos ao choque térmico foi aumentada em aproximadamente 15% ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferença entre a quantidade de HSP70 neste tecido entre os animais ovariectomizados, quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, os animais OVX foram ainda capazes de apresentar uma resposta acentuada ao choque térmico, com aumento de 40% no conteúdo de iHSP70 ($p < 0,01$). O choque térmico induziu o aumento de HSP70 em ambos os grupos, quando comparado aos seus controles não chocados ($p=0,0324$)

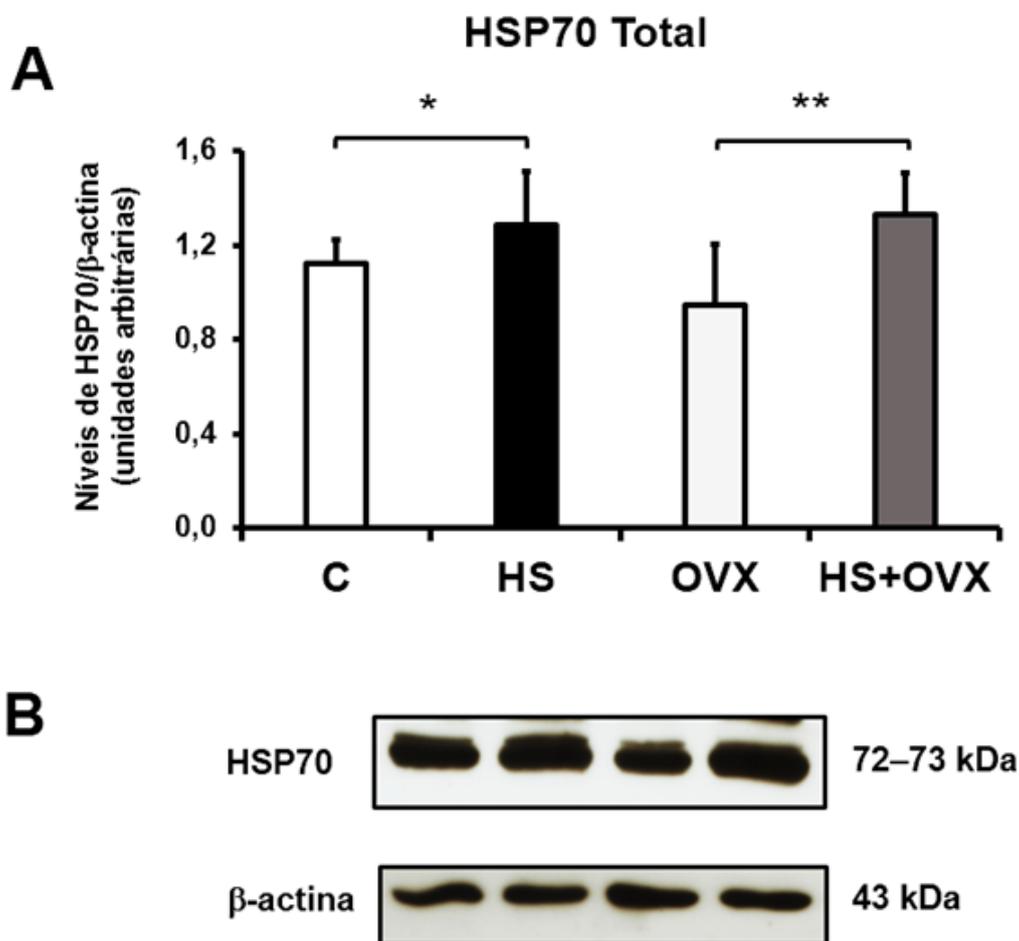


Figura 11. Expressão de iHSP70, por Western Blot, no arco aórtico de ratas Wistar submetidas a sessão de choque térmico, através de banho de imersão corporal. Os animais foram avaliados 12h após o término do choque térmico. **(C)** grupo controle e **(OVX)** grupo ovariectomia, banho de imersão a 37°C; **(HS)** grupo choque térmico e **(HS+OVX)** grupo choque térmico + ovariectomia, banho de imersão à 42°C, com $n = 4$ para os grupos HS e HS+OVX; $n = 5$ para os grupos C e OVX. Valor de significância para (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey-Kramer, $p = 0,0324$. Valores de iHSP70 foram normalizados pelo conteúdo celular de β-Actina.

A partir da decapitação dos animais, o sangue total foi coletado e após centrifugação foram obtidos o plasma e o soro dos animais. Com o plasma, foi realizada a dosagem de eHSP70 (extracelular, Figura 12), a qual não apresentou diferença significativa entre os grupos. Porém, percebe-se em ambos os grupos submetidos ao choque térmico mostram uma tendência de elevação na concentração plasmática em relação aos controles não chocados. Ao passo que os resultados apresentam uma redução relativa das concentrações para os grupos ovariectomizados.

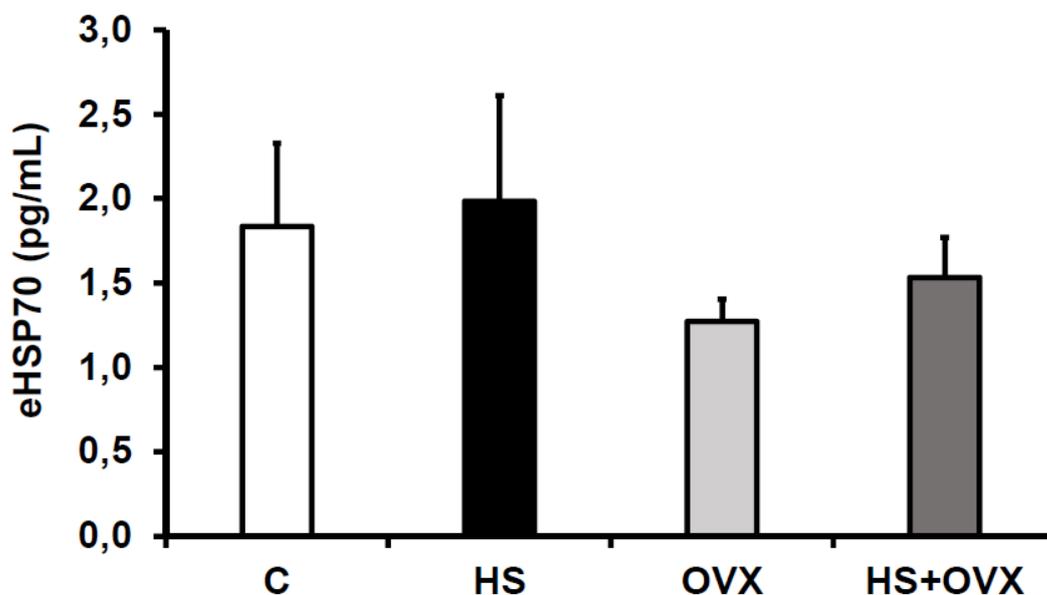


Figura 12. Concentração plasmática de eHSP70, por ELISA, de ratas Wistar submetidas a sessão de choque térmico, através de banho de imersão corporal. O sangue foi coletado 12h após o término do choque térmico, ao final do TTGip. **(C)** grupo controle e **(OVX)** grupo ovariectomia, banho de imersão a 37°C; **(HS)** grupo choque térmico e **(HS+OVX)** grupo choque térmico + ovariectomia, banho de imersão à 42°C, com n = 4 para os grupos HS e HS+OVX; n = 5 para os grupos C e OVX. Não foi detectada diferença significativa entre os grupos.

A avaliação da variável hormonal, 17β -estradiol, foi realizada por imunoensaio quimioluminescente competitivo, apresentou, de forma muito interessante, uma similaridade no padrão de resposta dos grupos quando observados pela ótica do procedimento cirúrgico de castração. Com média e desvio padrão muito semelhantes, independente do choque térmico. Os grupos submetidos a ovariectomia bilateral apresentaram redução de 25% na concentração plasmática de 17β -estradiol após 1 semana de *washout* (Figura 13)

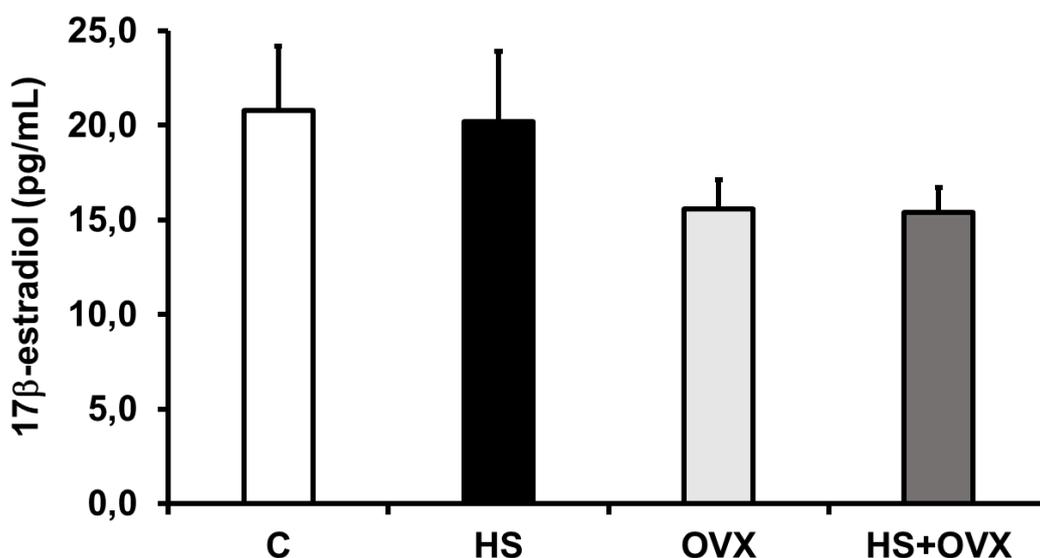


Figura 13. Níveis séricos de 17β -estradiol medidos por imunoensaio quimioluminescente competitivo. Sangue coletado 12h após o término do choque térmico, ao final do TTGip. **(C)** grupo controle e **(OVX)** grupo ovariectomia, banho de imersão a 37°C ; **(HS)** grupo choque térmico e **(HS+OVX)** grupo choque térmico + ovariectomia, banho de imersão à 42°C , com $n = 6$ para os grupos C, HS e HS+OVX; $n = 7$ para o grupo OVX. Não foi detectada diferença significativa entre os grupos.

Ao final do intervalo de doze horas após o protocolo de choque térmico proposto, realizou-se o Teste de tolerância a glicose via intraperitoneal para a construção da curva glicêmica dos animais experimentais (Figura 14). Detectou-se que todos os animais, independente da intervenção aplicada na noite anterior apresentaram padrões basais normoglicêmicos, com média de 80 mg/mL. Como resposta ao desafio metabólico da injeção de glicose, não houve diferença significativa entre os grupos no tempo 30 min, pico glicêmico proposto pelo teste, nem em nenhum outro ponto da curva. Tal achado apresenta que não houve interferência dos tratamentos aplicado (OVX ou HS), nem quando os mesmos foram sobrepostos (HS+OVX). Ainda, realizamos o cálculo da área incremental sob a curva (*Incremental area under curve* – IAUC), parâmetro relativo para a determinação do índice glicêmico dos animais. Novamente não obtivemos diferença entre os grupos, ratificando que este parâmetro metabólico não sofreu influência da privação de estrogênio, nem da sessão de choque térmico.

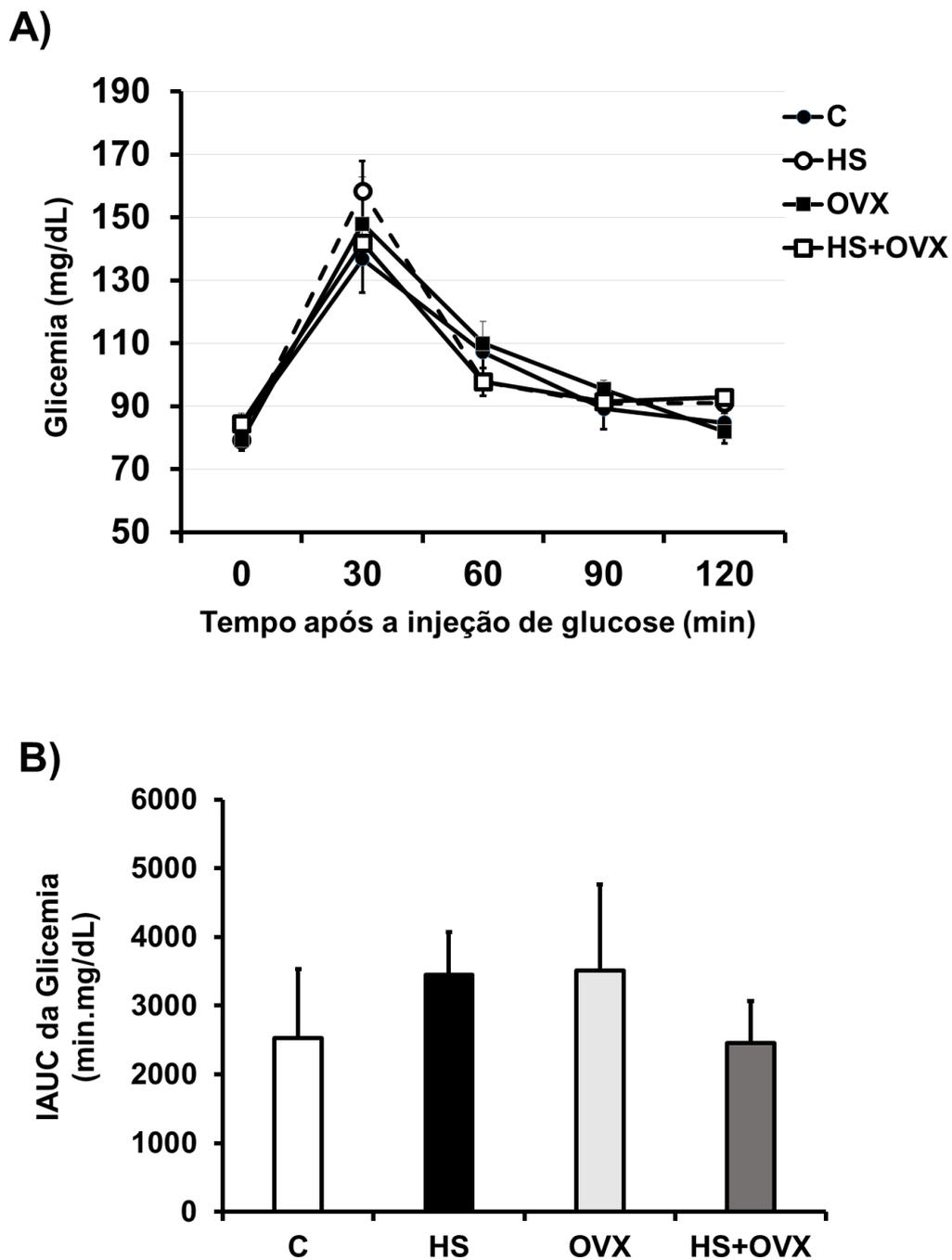


Figura 14. Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGip) realizado nos grupos experimentais: controle (**C**), ovariectomizado (**OVX**), choque térmico (**HS**) e choque térmico + ovariectomia (**HS+OVX**). Doze horas após a sessão de choque térmico, os animais receberam injeção intraperitoneal, com dose única de glicose (1g/kg). O sangue foi coletado nos intervalos de 30, 60, 90 e 120 minutos, a contar do tempo 0 (zero), com $n = 4$ para os grupos HS e HS+OVX; $n = 5$ para os grupos C e OVX. **(A)** Curva glicêmica foi construída no período de 120 minutos após a injeção. **(B)** Área incremental sob a curva (IAUC) a partir das médias dos animais em cada grupo testado. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M.

A seguir, as tabelas 1, 2 e 3 apresentam a síntese de todos os parâmetros metabólicos avaliados, bem como o resultado do tratamento estatístico e seus respectivos valores de significância, a partir das médias \pm desvio padrão (D.P.) ou erro padrão da média (E.P.M) quando aplicado.

Como mostrado na Tabela 3, nenhuma das intervenções foram capazes de modificar o número de leucócitos ou as demais variáveis investigadas, ou seja, nos elementos da linhagem vermelha, exceto os valores de PCR plasmática que foram encontrados significativamente ($p \leq 0,001$) reduzido em animais OVX submetidos ao tratamento térmico (HS+OVX).

TABELA 1 Peso e temperatura corporal dos animais dos grupos controle (C), ovariectomizado (OVX) e seus grupos emparelhados, submetidos ou não a sessão de choque térmico (grupos HS e OVX+HS)

Variável	Grupos			
	C	HS	OVX	OVX+HS
Peso corporal (g)				
Pré-cirúrgico	217.17 \pm 12.17	226.00 \pm 16.33	230.29 \pm 20.14	221.33 \pm 17.27
Pós- washout (7 dias)	212.33 \pm 10.65	222.17 \pm 17.38	222.29 \pm 18.87	215.17 \pm 18.45
Pós jejum de 12 h	208.00 \pm 10.08	219.50 \pm 12.41	215.29 \pm 15.53	210.67 \pm 19.12
Temperatura corporal (°C)				
Repouso	37.33 \pm 0.58	37.40 \pm 0.67	37.06 \pm 1.02	37.38 \pm 0.26
Final da sessão (HS)	37.42 \pm 1.05	40.38 \pm 0.63	38.00 \pm 0.89	40.63 \pm 0.35
Período de recuperação (30')	33.90 \pm 0.67	35.23 \pm 1.28	34.56 \pm 1.51	35.72 \pm 1.03

Valores apresentados em média \pm D.P.M; n = 6 para os grupos C, HS e OVX+HS; n = 7 para o grupo OVX

TABELA 2. Conteúdo intracelular de HSP70 no arco aórtico e parâmetros bioquímicos plasmáticos de ratas Wistar dos grupos controle (C), ovariectomizado (OVX) e seus grupos emparelhados, submetidos ou não a sessão de choque térmico (grupos HS e OVX+HS)

Variável	Grupos				ANOVA P valor e comparação						
	C	HS	OVX	OVX+HS	ANOVA	C x HS	C x OVX	C x OVX+HS	HS x OVX	HS x OVX+HS	OVX x OVX+HS
iHSP70 (unidades arbitrárias)*	1.00 ± 0.04	1.15 ± 0.09	0.85 ± 0.09	1.19 ± 0.08	0.0324	0.0097	ns	0.0097	0.0097	ns	0.0097
eHSP70 (ng/mL)	1.83 ± 0.38	1.98 ± 0.54	1.27 ± 0.12	1.53 ± 0.24	0.4799	ns	ns	ns	ns	ns	ns
eHSP70/iHSP70	1.00 ± 0.21	0.94 ± 0.27	0.82 ± 0.12	0.70 ± 0.12	0.4707	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SOD (U/ mg proteína)	0.020 ± 0.001	0.020 ± 0.002	0.022 ± 0.002	0.020 ± 0.002	0.7644	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CAT (nmol/ mg proteína)	3.50 ± 0.72	2.03 ± 0.36	3.55 ± 0.72	1.96 ± 0.31	0.1793	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TBARS (µM)	37.99 ± 4.77	53.52 ± 8.07	40.15 ± 4.29	33.30 ± 3.93	0.1323	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Estradiol (pg/mL)	20.77 ± 8.38	20.22 ± 9.00	15.59 ± 4.01	15.40 ± 3.23	0.3295	ns	ns	ns	ns	ns	ns

* iHSP70 foi avaliada no arco aórtico por imunoblotting, eHSP70 foi medida por ELISA e a razão $R = [(eHSP70)/(iHSP70)]$ foi calculada conforme descrito por Krause et al., 2015; Estradiol, SOD, CAT e TBARS foram avaliadas no plasma. Valores expressos em média ± E.P.M.; n = 4 para os grupos C, HS e OVX+HS; n = 5 para o grupo OVX

Tabela 3. Parâmetros hematológicos de ratas Wistar dos grupos controle (C), ovariectomizado (OVX) e seus grupos emparelhados, submetidos ou não a sessão de choque térmico (grupos HS e OVX+HS)

Variável	Grupos				ANOVA
	C	HS	OVX	OVX+HS	
WBC ($10^3/mm^3$)	8.00 ± 2.49	11.53 ± 3.19	8.58 ± 1.79	12.35 ± 4.17	0.1391
%LYM	45.23 ± 15.03	32.75 ± 9.44	42.98 ± 3.67	44.65 ± 5.44	0.2279
%MON	20.38 ± 2.69	15.98 ± 5.60	17.42 ± 4.90	19.73 ± 4.61	0.5158
%GRA	34.40 ± 13.66	51.28 ± 11.89	39.84 ± 7.09	35.63 ± 6.87	0.1233
#LYM ($10^3/mm^3$)	3.45 ± 1.01	3.88 ± 2.00	3.62 ± 0.87	5.38 ± 1.33	0.2048
#MON ($10^3/mm^3$)	1.58 ± 0.43	1.83 ± 0.95	1.48 ± 0.58	2.30 ± 0.50	0.2943
#GRA ($10^3/mm^3$)	2.98 ± 1.81	5.83 ± 1.05	3.48 ± 0.79	4.68 ± 2.59	0.1116
Tipos (unidades)					
Basófilos	2.75 ± 2.06	4.00 ± 2.16	2.40 ± 1.14	2.75 ± 0.96	0.5262
Neutrófilos	43.50 ± 16.34	56.50 ± 7.94	44.60 ± 4.67	45.50 ± 6.61	0.2377
Eosinófilos	0.75 ± 0.96	0.25 ± 0.50	0.80 ± 0.84	0.75 ± 0.50	0.6813
Monócitos	4.25 ± 0.50	4.50 ± 1.29	4.20 ± 1.10	2.75 ± 2.06	0.2814
Linfócitos	48.75 ± 17.56	34.75 ± 10.50	48.00 ± 5.57	48.25 ± 6.70	0.2345
RBC ($10^6/mm^3$)	7.56 ± 0.44	8.19 ± 0.79	7.57 ± 0.45	7.15 ± 0.56	0.1276
HGB (g/dL)	14.00 ± 0.57	14.98 ± 1.81	14.18 ± 0.36	13.25 ± 0.82	0.1696
HCT (%)	42.03 ± 1.51	45.70 ± 5.51	42.62 ± 1.76	39.70 ± 2.72	0.1150
PLT ($10^3/mm^3$)	460.00 ± 218.90	436.75 ± 240.16	516.80 ± 115.05	691.50 ± 101.65	0.2116
PCT (%)	0.32 ± 0.14	0.31 ± 0.13	0.38 ± 0.09	0.45 ± 0.05	0.2887
MCV (fm^3)	55.50 ± 1.73	55.50 ± 1.73	56.20 ± 2.39	55.25 ± 0.96	0.8724
MCH (pg)	18.55 ± 0.87	18.30 ± 0.57	18.80 ± 1.10	18.58 ± 0.54	0.8473
MCHC (g/dL)	33.33 ± 0.75	32.80 ± 0.67	33.28 ± 0.74	33.43 ± 0.50	0.5802
RDW (%)	13.18 ± 1.01	13.83 ± 1.45	13.84 ± 0.82	13.53 ± 0.39	0.7375
MPV (fm^3)	7.15 ± 0.60	8.30 ± 2.73	7.22 ± 0.52	6.53 ± 0.43	0.3733
PDW (%)	4.40 ± 3.32	3.75 ± 3.59	5.76 ± 2.58	8.60 ± 2.09	0.1422
ESR (mm/1h)	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	2.20 ± 0.45	2.00 ± 0.00	0.5338
CRP (mg/L)					χ^2
< 6mg/L	4 (67%)	4 (67%)	4 (57%)	5 (83%)	0.160816
> 6mg/L	2 (33%)	2 (33%)	3 (43%)	1 (17%)	(p<0,001)

Valores expressos em média ± D.P.M.; n = 4 para os grupos C, HS e OVX+HS; n = 5 para o grupo OVX no hemograma padrão. Para a CRP, n = 6 para os grupos C, HS e OVX+HS; n = 7 para o grupo OVX.

WBC= leucócitos; %LYM= percentual de linfócitos; %MON= percentual de monócitos; %GRA= percentual de granulócitos; #LYM= contagem total de linfócitos; #MON= contagem total de monócitos; #GRA= contagem total de granulócitos; RBC= Eritrócitos; HGB= hemoglobina; HCT= hematócrito; PLT= Contagem total de plaquetas; MCV= volume corpuscular médio; MCH= hemoglobina corpuscular média; MCHC= concentração da hemoglobina corpuscular média; RDW= amplitude da distribuição de eritrócitos; MPV= volume plaquetário médio; PDW= amplitude da distribuição de plaquetas; ESR= taxa de hemossedimentação; CRP= proteína C reativa.

DISCUSSÃO

Atualmente, é consenso que a disfunção endotelial inflamatória é o evento inicial para o desenvolvimento da aterosclerose, principal indutor de doenças cardiovasculares (DCV) graves. O claro entendimento da correlação entre o distúrbio endotelial e a lesão vascular proporciona avanços nos estudos da fisiopatologia da aterosclerose. Em decorrência disso, diferentes evidências sugerem que as intervenções nas células endoteliais possam agir, tanto como inibidores do progresso da lesão tecidual e do risco de eventos cardiovasculares (Maturana et al., 2007), como também sendo capazes de induzir cura total em modelos de aterosclerose em camundongos (Homem de Bittencourt et al., 2007). Neste contexto, a expressão de proteínas de choque térmico na aorta, especialmente de 70 kDa (HSP70) tem papel anti-inflamatório importante no combate ao desenvolvimento da aterosclerose (Homem de Bittencourt et al., 2007) e sua modulação em um ambiente privado de estrogênio pode levar o organismo a buscar outros estímulos endógenos, como os fogachos.

A susceptibilidade aumentada às DCV, que acomete as mulheres no climatério é objeto de grande preocupação, pois a gênese das diferentes disfunções que conduzem às cardiopatias ainda apresentam lacunas em suas vias. Assim a avaliação do *status* proteico durante eventos característicos da menopausa, em humanos e modelos animais, trará novas possibilidades para a prática clínica. Além disso, avanços no contexto da terapia térmica irão contribuir para construção de estratégias terapêuticas não farmacológicas para a prevenção de doenças cardiovasculares, bem como a melhoria da qualidade de vida de mulheres pós menopausa.

As alterações metabólicas decorrentes da privação hormonal podem refletir em aspectos estruturais, como a massa corporal. Nossos dados demonstraram que todos os animais tiveram redução de peso de forma semelhante, independente da castração. Estudos recentes, que acompanharam a evolução do peso corporal de ratas OVX, com diferentes tipos de reposição hormonal (dose fisiológica vs dose farmacológica vs óleo vegetal) demonstrou que os animais ovariectomizados perdem peso logo na primeira semana pós castração, enquanto o grupo controle mantém o peso inicial (Kafkas et al., 2012). Porém os autores não relataram a realização de *sham operation* para padronização do estresse. Deste modo, acreditamos que a redução uniforme que ocorreu nos grupos experimentais, em nosso trabalho, seja reflexo da cirurgia em si, o que sustenta a ideia de padronização do estresse cirúrgico buscado, e não um efeito a curto prazo da remoção dos ovários.

A temperatura corporal é o elemento chave na discussão dos sintomas vasomotores, em especial os fogachos. Inúmeros estudos demonstraram que diferentes tipos de termoterapias foram eficazes na modulação de fatores envolvidos na gênese e perpetuação do diabetes e síndrome metabólica em humanos e modelos animais. O uso de *hot tub* (Hooper et al., 1999), sauna (Biro et al., 2003; Beever, 2010), manta térmica (Chung et al., 2008; Gupte et al., 2011) e banho de imersão em água quente (Gupte et al., 2009; Bathaie et al., 2010), mostraram resultados positivos como a redução da P.A.; redução da fosforilação de JNK e IKK β ; redução de LDL e aumento de HDL colesterol.

Neste sentido, a sessão de choque térmico proposto como intervenção pelo nosso laboratório foi capaz de aumentar expressão de HSP70 no arco aórtico dos animais em aproximadamente 15% ($p < 0,05$), em relação ao grupo

controle. No entanto, não houve diferença entre os níveis de HSP70 das ratas OVX quando comparado ao mesmo grupo controle. Por outro lado, os animais OVX foram capazes de apresentar uma resposta maior ao choque térmico (HSP70 aumento de 40%, $p < 0,01$), em relação ao grupo chocado sem castração, quando comparado com o grupo OVX não chocado. Estas evidências sugerem que, embora os estrogênios sejam moduladores da termoneutralidade hipotalâmica em níveis fisiológicos, a redução de estrogênio não foi capaz de impedir, a curto prazo, a capacidade do tecido aórtico em responder ao choque térmico com a expressão de HSP70 (Dacks & Rance, 2010). Logo, de forma objetiva, a *Heat Shock Response* parece ser preservada, mesmo na ausência do estradiol.

Evidências experimentais recentes do nosso grupo, bem como demonstrado por outros estudos, suportam a conclusão de que a relação entre HSP70 plasma (eHSP70) e tecido HSP70 intracelular (iHSP70) pode ser um eficiente preditor do *status* imunoinflamatório, especialmente para doenças inflamatórias crônicas (Krause et al., 2015a). De fato, alterações no valor da relação $R = [(eHSP70)/(iHSP70)]$, surge como um novo biomarcador, em potencial, para a inflamação, e como um indicador muito sensível do estado inflamatório (Krause et al., 2015b). Por isso, nos levantamos a seguinte questão: poderia a OVX afetar a relação R de HSP70 sob condições controle e estimulada pelo calor? Como mostrado na Figura 11, o tratamento térmico induziu um aumento esperado no conteúdo iHSP70 aórtica (12 h após choque térmico), tanto em ratas controle, quanto em animais OVX ($p = 0,0324$), enquanto nenhuma alteração foi observada na eHSP70 circulante. Conseqüentemente, nenhuma mudança significativa na relação eHSP70 vs iHSP70 foi evidenciado.

Isso significa que, a curto prazo, a OVX não interferiu no *status* imunoinflamatório dos animais. Neste mesmo grupo de animais, estudos preliminares avaliaram a presença de proteína C reativa (PCR) como marcador de resposta inflamatória aguda, pós ovariectomia e choque térmico. Percebemos uma tendência de que o choque térmico não altera a reatividade dos animais intactos (grupos; C=33% e HS=33%), mas pode reduzir substancialmente a reatividade em animais ovariectomizadas (grupos; OVX=43% e HS+OVX=17%). Assim, nossos resultados apresentaram um aumento significativo na tendência de risco relativo para PCR+, 2,5 vezes menor nas HS+OVX quando comparadas com as OVX ($\chi^2 = 0,160816$; $p < 0,001$). Portanto, as alterações no status da HSP70 observadas em pacientes e animais portadores de doenças inflamatórias crônicas decorrentes da hipoestrogenia não estão diretamente relacionadas à falta de estrogênios, mas sim a algum distúrbio crônico decorrente da falta de estrogênios.

Paralelamente, buscamos acompanhar se o tratamento térmico seria capaz de alterar a atividade das enzimas antioxidantes no plasma e TBARS (tabela 2). Nenhuma mudança significativa foi observada nestas variáveis. Isto pode explicar, pelo menos parcialmente, o porquê a *Heat Shock Response*, a qual é dependente da integridade do estado redox intracelular (Ahn & Thiele, 2003), foi mantida após a retirada dos ovários, ou seja, a privação de estrogênio. Portanto, embora a deficiência de estrogênio, a longo prazo, esteja associada ao estresse oxidativo e disfunção endotelial (Wassmann et al., 2001), isto não parece ser o que ocorre neste caso, ao menos num período de observação de curto prazo (7 dias).

É consenso que o metabolismo da glicose, está intimamente relacionado com o metabolismo da HSP70, em particular, com a eHSP70 no plasma. A redução da glicemia em ratos demonstrou aumentar os níveis plasmáticos de eHSP70 (Ludwig et al., 2014). Por outro lado, a elevação induzida por exercício em eHSP70 em seres humanos pode ser completamente abolida através da administração de glicose (Febbraio et al., 2004). Então, procuramos avaliar o efeito da castração (OVX), de forma isolada ou combinada com choque térmico, e como ela poderia modificar a resposta glicêmica através de uma sobrecarga de glicose (TTGip). Como representado na Figura 12, nem a ovariectomia, tampouco o choque térmico sobre a castração, foi capaz de modificar as curvas glicêmicas até 120 min após a injeção de glicose. Além disso, não houve diferença significativa entre os valores das áreas incrementais sob às curvas (IAUC) dos animais experimentais. Portanto, a redução de estrogênio, ao menos à curto prazo, parece não interferir em outro importante ponto metabólica relacionada com HSP70: respostas glicêmicas a partir de sobrecargas de glicose.

Todos os resultados acima foram até agora inesperados, pois até então, nós supúnhamos que, a partir da privação de estrogênio, as respostas teciduais ao choque térmico seriam em sua maioria interferidas, uma vez que os estrogênios estão envolvidos na expressão fisiológica de HSP70 em ambas as situações: normais e de estresse (Hamilton et al., 2004a; Hamilton et al., 2004b; Stice and Knowlton, 2008). Portanto, analisou-se ainda a possibilidade de que a ovariectomia, isoladamente ou acompanhada de choque térmico pudesse mudar os parâmetros hematológicos dos animais, especialmente porque há fortes evidências de um papel de apoio para a HSP70 na regulação da função celular

imune (Heck et al., 2011). Como mostrado na Tabela 3, nenhum das intervenções propostas neste estudo foram capazes de modificar a contagem de leucócitos, eritrócitos, plaquetas ou quaisquer uma das variáveis hematológicas estratificadas sob investigação. Isto também é surpreendente, pois, a ausência de estrogênio (pelo menos a privação a longo prazo) é conhecida por induzir a perda óssea em roedores devido a uma resposta inflamatória exacerbada, a partir do aumento das funções das células T e da produção de $TNF\alpha$ (Cenci et al., 2000).

De modo geral, os resultados sugerem que, a *Heat Shock Response* ainda esteja preservada, ao menos logo após o início da privação de estrogênio (primeira semana pós castração) e isso não foi acompanhado por nenhuma alteração nas características fisiológicas importantes do animal, tais como o estado redox, o controle glicêmico e os parâmetros hematológicos. Isto é digno de nota porque, a conhecida redução da expressão HSP70 em doenças inflamatórias crônicas está correlacionada com a piora do quadro no diabetes, em pacientes obesos (Rodrigues-Krause et al., 2012), com a gravidade da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em seres humanos (Di Naso et al., 2015) e da disseminação do processo inflamatório por todo o corpo (Newsholme and Homem de Bittencourt, 2014). Portanto, é plausível supor que, após a queda inicial nas concentrações de estrogênio, deve haver um período em que a *Heat Shock Response* torna-se ameaçada, o que pode levar a muitas disfunções fisiológicas que acompanham a menopausa.

Se os fogachos constituem realmente uma resposta fisiológica do hipotálamo, pela ausência de um importante fator indutor de HSP70, o estrogênio, permanece uma especulação. No entanto, com a queda dos níveis

de estrogênio, sabe-se que ocorre o aumento dos níveis de norepinefrina, o que provoca um aumento nos receptores de serotonina hipotalâmicos e alterações na zona termoneutra (Krause & Nakajima, 2015; Stearns et al., 2002). Além disso, a estimulação α -adrenérgica (central e periférica) mostrou aumentar a expressão de HSP70 intracelular (Rossato et al., 2014), bem como a exportação de HSP70 para a circulação (Johnson et al., 1985). Portanto, a hipótese de que os fogachos estejam ocorrendo para ajudar a *Heat Shock Response* não pode ser descartada.

Enfim, sugerimos que a avaliação periódica do *status* de HSP70 (iHSP70 vs eHSP70) pode ser de extrema relevância clínica, pois a diminuição da capacidade de defesa do organismo via *Heat Shock Response* está no centro do aparecimento de disfunções relacionadas com a menopausa. Sendo assim, o acompanhamento rigoroso dos níveis de HSP70 em pacientes peri- e pós-menopausadas (para a identificação do início da falência da HS response), bem como manobras de indução de HSP70 (exercício físico, banheira de hidromassagem) poderia ser de grande valor na prevenção de disfunções relacionadas à menopausa.

CONCLUSÃO

A sessão de choque térmico proposta neste estudo foi capaz de induzir a expressão de iHSP70 no arco aórtico de ratas Wistar, independente da ovariectomia o que sugere não serem os estrogênios os responsáveis diretos pela queda da responsividade do organismo ao choque térmico. Uma vez que, durante o envelhecimento, ocorre uma redução natural, tanto da biodisponibilidade de estrogênio, quanto na produção/indução de HSP70, podemos aceitar que, na apesar do estrogênio induzir a expressão de HSP70 via NF- κ B e HSF1, a via da *Heat Shock Response* parece estar preservada, pelo menos no curto prazo. Experimentos de longo prazo estão sendo conduzidos em nosso laboratório para avaliarmos o efeito da remoção crônica e reposição hormonal com 17 β -estradiol.

Por fim, concluímos que o efeito agudo de uma sessão de choque térmico, em ratas ovariectomizadas com idade reprodutiva avançada é capaz de induzir iHSP70 nos vasos, em especial, o arco aórtico. E isso, sendo um efeito independente da privação hormonal ovariana, incapaz de provocar alterações secundárias, em nível metabólico, ao menos no que se refere ao estado redox, resposta glicêmica e parâmetros hematológicos. O que, pode vir a ser um modelo de estudo, para um futuro próximo ser transformado em uma possibilidade real de intervenção clínica terapêutica para mulheres na menopausa, a fim de subir a temperatura corpórea no sentido de restabelecer a expressão HSP70 e, conseqüentemente, uma resposta anti-inflamatória centrada na HSP70, o que nós acreditamos ser realizado pelos episódios de fogacho, os quais estão associados problemas e não solução fisiológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abdelmohsen K, Pullmann R Jr, Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X, Blethrow JD, Walker M, Shubert J, Gillespie DA, Furneaux H, Gorospe M (2007). Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell.*, 25(4):543-57
2. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121.
3. Ahn SG, Thiele DJ (2003) Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev* 17(4):516-28.
4. Anckar J, Sistonen L (2011) Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu Rev Biochem* 80:1089-115. doi: 10.1146/annurev-biochem-060809-095203.
5. Aravinthan A, Scarpini C, Tachtatzis P, Verma S, Penrhyn-Lowe S, Harvey R, Davies SE, Allison M, Coleman N, Alexander G. Hepatocyte senescence predicts progression in non-alcohol-related fatty liver disease. *J Hepatol.* 2013 Mar;58(3):549-56. doi: 10.1016/j.jhep.2012.10.031
6. Arnal J-F, Gourdy P, Elhage R, Garmy-Susini B, Delmas E, Brouchet L, Castano C, Barreira Y, Couloumiers JC, Prats H, Prats A-C, Bayard F. Estrogens and atherosclerosis. *European Journal of Endocrinology* 2004; 150:113–117.
7. Askel S, Schomberg DW, Tyrey L, Hammond CB. Vasomotor symptoms, serum estrogens, gonadotropin levels in surgical menopause. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 126:165–169.
8. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 2008; 319:(5865)916–919.
9. Basta D, Tzschentke B, Nichelmann M. Temperature guardian neurons in the preoptic area of the hypothalamus. *Brain Res* 1997; 767:361–2.
10. Beckmann RP, Lovett M, Welch WJ. Examining the Function and Regulation of hsp 70 in Cells Subjected to Metabolic Stress. *The Journal of Cell Biology* 1992; 117: 1138-50.
11. Bedell SE, Bush BT (1985) Erythrocyte sedimentation rate. From folklore to facts. *Am J Med* 78(6 Pt 1):1001-9.

12. Beevi SS1, Rasheed AM, Geetha A. Evaluation of oxidative stress and nitric oxide levels in patients with oral cavity cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2004 Jul;34(7):379-85.
13. Benjaminand IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research* 1998; 83:(2)117–132.
14. Bernis C and Reher DS, Environmental contexts of menopause in Spain: comparative results from recent research. *Menopause* 2007; 14: 777–87.
15. Biden TJ, Boslem E, Chu KY, Sue N. Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, β cell failure, and type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* 2014 Mar 18. pii: S1043-2760(14)00030-7. doi: 10.1016/j.tem.2014.02.003
16. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL (2002) Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med* 2002; 8:1218–1226.
17. Bodega et al., *JHistochem Cytochem* September 2002 vol. 50 no. 9 1161-1168 doi: 10.1177/002215540205000902)
18. Bombardier E, Vigna C, Bloemberg D, Quadrilatero J, Tiidus PM, Tupling AR (2013) The role of estrogen receptor- α in estrogen-mediated regulation of basal and exercise-induced Hsp70 and Hsp27 expression in rat soleus. *Can J Physiol Pharmacol* 91(10):823-29.
19. Boo YC and Jo H, Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Cell Physiology* 2003; 285: C499–C508.
20. Borrás C, Gambini J, M. C. Gomez-Cabrera MC, et al. 17 β -oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2(MAPK)/NF κ B cascade. *Aging Cell* 2005; (4)113–118.
21. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and

- thermogenesis. *Nature*. 2012 Jan 11;481(7382):463-8. doi: 10.1038/nature10777.
22. Bosworth HB, Bastian LA, Kuchibhatla MN, Steffens DC, McBride CM, Skinner CS, Rimer BK, Siegler IC. Depressive symptoms, menopausal status, and climacteric symptoms in women at midlife. *Psychosom Med*. 2001; 63(4):603-8.
 23. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
 24. Brocchieri L, de Macario EC, Macario AJL. Hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol Biol* 2008; 8: 19.
 25. Brown ET, Umino Y, Loi T, Solessio E and Barlow R (2005) Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. *Vis Neurosci* 22:615-8. doi: 10.1017/S0952523805225105
 26. Bruce CR, Carey AL, Hawley JA, Febbraio MA. Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes:evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. *Diabetes*. 2003 Sep;52(9):2338-45.
 27. Brussard HE, Leuven JAG, Klufft C. Effect of 17-beta estradiol on plasma lipids and LDL oxidation in postmenopausal women with type II diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:324-330.
 28. Buege JA, Aust, SD. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52:302-309.
 29. Burton DG. Cellular senescence, ageing and disease. *Age (Dordr)*. 2009 Mar;31(1):1-9. doi: 10.1007/s11357-008-9075-y.
 30. Calapre L, Gray ES, Ziman M. Heat stress: a risk factor for skin carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2013 Aug 28;337(1):35-40. doi:10.1016/j.canlet.2013.05.039. Epub 2013 Jun 5.
 31. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, Velloso LA, Curi R, Saad MJ. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes*. 2005 Apr;54(4):959-67.

32. Casper RF, Yen SSC, Wilkes MM. Menopausal flushes: a neuroendocrine link with pulsatile luteinizing hormone secretion. *Science* 1979; 204:823–825.
33. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R (2000) Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . *J Clin Invest* 106(10):1229-37.
34. Chakraborty TR, Ng L, Gore AG. Age-related changes in estrogen receptor beta in rat hypothalamus: a quantitative analysis. *Endocrinology*. 2003;144: 4164-4171.
35. Chalkiadaki A, Guarente L. High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. *Cell Metab*. 2012 Aug 8;16(2):180-8. doi: 10.1016/j.cmet.2012.07.003
36. Chang Y, Chen TL, Sheu JR and Chen RM (2005) Suppressive effects of ketamine on macrophage functions. *Toxicol Appl Pharmacol* 204:27-35. doi: 10.1016/j.taap.2004.08.011
37. Chen HW, Kuo HT, Wang SJ, Lu TS, Yang RC. In vivo heat shock protein assembles with septic liver NF- κ B/I- κ B complex regulating NF- κ B activity. *Shock*. 2005 Sep;24(3):232-8.
38. Chen JX, Meyrick B. Hypoxia increases HSP90 binding to eNOS via PI3K-Akt in porcine coronary artery endothelium. *Lab Invest*. 2004;84:182–190.
39. Christensen K, Doblhammer G, Rau R and Vaupel JW. Aging populations: the challenges ahead. *Lancet* 2009; 374(9696):1196–1208.
40. Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MH, Mesa JL, Lancaster GI, Southgate RJ, Bruce CR, Duffy SJ, Horvath I, Mestrlil R, Watt MJ, Hooper PL, Kingwell BA, Vigh L, Hevener A, Febbraio MA (2008) HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(5):1739-44. doi: 10.1073/pnas.0705799105.
41. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med*. 2012 Jan;18(1):59-68. doi: 10.1016/j.molmed.2011.07.010.
42. Collins PL, Hightower LE. Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat shock) mRNAs and proteins. *J Virol* 1982; 44:703–7.

43. Dacks PA, Rance NE (2010) Effects of estradiol on the thermoneutral zone and core temperature in ovariectomized rats. *Endocrinology* 151(3):1187-1193. doi:10.1210/en.2009-1112.
44. Daley A, MacArthur C, McManaus R, et al. Factors associated with the use of complementary medicine and non-pharmacological interventions in symptomatic menopausal women. *Climateric* 2006; 9(5):336–346.
45. Dancsó B, Spiró Z, Arslan MA, Nguyen MT, Papp D, Csermely P, Soti C. The heat shock connection of metabolic stress and dietary restriction. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010 Feb;11(2):139-45.
46. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:707-35. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101405.
47. De Nardo D, Latz E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol*. 2011 Aug;32(8):373-9. doi: 10.1016/j.it.2011.05.004.
48. de Thonel A, Le Mouël A, Mezger V (2012) Transcriptional regulation of small HSP-HSF1 and beyond. *Int J Biochem Cell Biol* 44(10):1593-612. doi: 10.1016/j.biocel.2012.06.012.
49. Dennerstein L, Dudley EC, Hopper JL, Guthrie JR, Burger HG: A prospective population-based study of menopausal symptoms. *Obstetrics & Gynecology* 2000; 96:351–358.
50. Di Naso FC, Porto RR, Fillmann HS, Maggioni L, Padoin AV, Ramos RJ, Mottin CC, Bittencourt A, Marroni NA, Homem de Bittencourt PI Jr. (2015) Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression. *Obesity (Silver Spring)* 23(1):120-9. doi: 10.1002/oby.20919
51. Doshi SB, Agarwal A. The role of oxidative stress in menopause. *Midlife Health* 2013; 4(3): 140–146.
52. Erlik Y, Meldrum DR, Judd HL. Estrogen levels in postmenopausal women with hot flashes. *Obstet Gynecol* 1982; 59(4):403-7.
53. Febbraio MA, Mesa JL, Chung J, Steensberg A, Keller C, Nielsen HB, Krstrup P, Ott P, Secher NH and Pedersen BK (2004) Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock

- protein 72 and heat shock protein 60 in humans. *Cell Stress Chaperones* 9:390-6.
54. Frassetto LA, Schloetter M, Mietus-Synder M, Morris RC Jr, Sebastian A. Metabolic and physiologic improvements from consuming a paleolithic, hunter-gatherer type diet. *Eur J Clin Nutr.* 2009 Aug;63(8):947-55. doi: 10.1038/ejcn.2009.4.
 55. Freedman RR. Menopausal hot flashes: Mechanisms, endocrinology, treatment. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2014; 142:115–120.
 56. Freeman EW, Sammel MD, Lin H, et al. Symptoms associated with menopausal transition and reproductive hormones in midlife women. *Obstet Gynecol.* 2007;110(2 Pt 1):230–240
 57. Fu Y, Wang Y, Du L, Xu C, Cao J, Fan T, Liu J, Su X, Fan S, Liu Q, Fan F. Resveratrol inhibits ionising irradiation-induced inflammation in MSCs by activating SIRT1 and limiting NLRP-3 inflammasome activation. *Int J Mol Sci.* 2013 Jul 8;14(7):14105-18. doi: 10.3390/ijms140714105.
 58. Gambone J, Meldrum DR, Laufer L, Chang RJ, Lu JKH, Judd HL, Further delineation of hypothalamic dysfunction responsible for menopausal hot flashes, *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59:1097–1100.
 59. Gecit I, Aslan M, Gunes M, Pirincci N, Esen R, Demir H, Ceylan K. Serum prolidase activity, oxidative stress, and nitric oxide levels in patients with bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012 May;138(5):739-43. doi: 10.1007/s00432-011-1136-4. Epub 2012 Jan 19.
 60. George J, Afek A, Gilburd B, Levkovitz H, Shaish A, Goldberg I, Kopolovic Y, Wick G, Shoenfeld Y, Harats D. Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis. *Atherosclerosis* 1998 138:147–152.
 61. Giannoni E, Guignard L, Reymond MK, Perreau M, Roth-Kleiner M, Calandra T, Roger T. Estradiol and Progesterone Strongly Inhibit the Innate Immune Response of Mononuclear Cells in Newborns *Infect Immun* 2011; 79(7): 2690–2698.
 62. Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory

- properties. *Nat Med.* 1999 Jun;5(6):698-701. •This is a classic manuscript showing that COX-2 generates eicosanoids for the resolution phase of inflammation.
63. Goloubkova T, Ribeiro MF, Rodrigues LP, Cecconello AL, Spritzer PM (2000) Effects of xenoestrogen bisphenol A on uterine and pituitary weight, serum prolactin levels and immunoreactive prolactin cells in ovariectomized Wistar rats. *Arch Toxicol* 74(2):92-8.
 64. Gorospe M, de Cabo R. AsSIRting the DNA damage response. *Trends Cell Biol.* 2008 Feb;18(2):77-83. doi: 10.1016/j.tcb.2007.11.007.
 65. Govindaraju S, Lee BS. Adaptive and maladaptive expression of the mRNA regulatory protein HuR. *World J Biol Chem.* 2013 Nov 26;4(4):111-118.
 66. Grady D, Sawaya GF, Johnson KC, et al. MF101, a selective estrogen receptor A modulator for the treatment of menopausal hot flashes: a phase II clinical trial. *Menopause* 2009; 16: 3 doi: 10.1097/gme.0b013e31818e64dd
 67. Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons JF, Du L, Egholm M, Rothberg JM, Paunovic M, Pääbo S. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature.* 2006 Nov 16;444(7117):330-6.
 68. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity, *Annual Review of Immunology.* 2011; 29:415-45.
 69. Guetta V, Panza JA, Waclawiw MA, Cannon RO. Effect of combined 17-beta estradiol and vitamin E on low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women. *Am J Cardiol* 1995; 75:1274-76.
 70. Gupta A, Cooper ZA, Tulapurkar ME, Potla R, Maity T, Hasday JD, Singh IS. Toll-like receptor agonists and febrile range hyperthermia synergize to induce heat shock protein 70 expression and extracellular release. *J Biol Chem.* 2013 Jan 25;288(4):2756-66. doi: 10.1074/jbc.M112.427336.
 71. Gutierrez LL, Maslinkiewicz A, Curi R, Homem de Bittencourt PI Jr. Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. *Biochem Pharmacol.* 2008 Jun 15;75(12):2245-62. doi: 10.1016/j.bcp.2008.03.002.

72. Hamilton KL, Gupta S, Knowlton AA (2004a) Estrogen and regulation of heat shock protein expression in female cardiomyocytes: cross-talk with NF kappa B signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2004 36(4):577-84.
73. Hamilton KL, Mbai FN, Gupta S, Knowlton AA (2004b) Estrogen, heat shock proteins, and NF- κ B in human vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(9):1628-33.
74. Hamilton KL, Mbai FN, Gupta S, Knowlton AA. Estrogen, Heat Shock Proteins, and NF κ B in Human Vascular Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ;24:1628-1633.
75. Hamilton KS, Gupta S, Knowlton AA. Estrogen and Regulation of Heat Shock Protein Expression in Female Cardiomyocytes: Cross-talk with NF κ B Signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36:579–586.
76. Hansson GK. Vaccination against atherosclerosis. Science or fiction? *Circulation* 2002; 106:1599–1601.
77. Heck TG, Scholer CM and de Bittencourt PI (2011) HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochem Funct* 29:215-26. doi: 10.1002/cbf.1739
78. Heck TG, Schöler CM, Homem de Bittencourt Jr. PI. HSP70 expression: does it a novel fatigue signaling factor from immune system to the brain? *Cell Biochem Funct* 2011; 29(3):215-226.
79. Henderson B, Pockley AG (2010) Molecular chaperones and protein folding catalysts as intercellular signalling regulators in immunity and inflammation. *J Leukoc Biol* 88:445–462
80. Henderson B, Pockley AG. Proteotoxic stress and circulating cell stress proteins in the cardiovascular diseases. *Cell Stress and Chaperones* 2012; 17:303–311.
81. Hill K. The demography of menopause. *Maturitas* 1996; 23:113-127.
82. Ho FM, Lin WW, Chen BC et al., High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through NF- κ B and c-Jun NH2-terminal kinase pathway and prevented by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Cellular Signalling* 2006; 18: 391–399.
83. Homem de Bittencourt PI Jr., Lagranha DJ, Maslinkiewicz A, Senna SM, Tavares AMV, Baldissera P, Janner DR, Peralta JS, Bock PM, Gutierrez LLP, Scola G, Heck TG, Krause MS, Cruz LA, Abdalla DSP, Lima T, Curi

- R (2007) LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 193(2):245-258. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.049
84. Hooper PL, Balogh G, Rivas E, Kavanagh K, Vigh L. The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones*. 2014 Feb 13. (Epub ahead of print). Doi: 10.1007/s12192-014-0493-8. •In this review, the intricate connection between the heat shock response and the physiology of AMPK, PGC-1 α and sirtuins in the context of type 2 diabetes was discussed.
85. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat Med*. 2010 Apr;16(4):396-9. doi: 10.1038/nm0410-396.
86. Hulley S, Furberg C, Barrett-Connor E, Cauley J, Grady D, Haskell W, Knopp R, Lowery M, Satterfield S, Schrott H, Vittinghoff E, Hunninghake D; HERS Research Group. Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002; 3 288(1):58-66.
87. Jin J, Yu Q, Han C, Hu X, Xu S, Wang Q, Wang J, Li N, Cao X. LRRFIP2 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages by promoting Flightless-I-mediated caspase-1 inhibition. *Nat Commun*. 2013;4:2075. doi: 10.1038/ncomms3075.
88. Johnson JD, Campisi J, Sharkey CM, Kennedy SL, Nickerson M, Fleshner M (1985) Adrenergic receptors mediate stress-induced elevations in extracellular Hsp72. *J Appl Physiol* 99(5):1789-95.
89. Jones CM, Boelaert K. The Endocrinology of Ageing: A Mini-Review. *Gerontology*. 2014 Nov 27.
90. Jones CM, Boelaert K. The Endocrinology of Ageing: A Mini-Review. *Gerontology* DOI: 10.1159/000367692
91. Jung TW, Lee KT, Lee MW, Ka KH. SIRT1 attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in HepG2 cells via induction of oxygen-regulated protein 150. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jun 1;422(2):229-32. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.129.

92. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14(1): 105–111.
93. Kanda N, Watanabe S. 17beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. *J Invest Dermatol* 2003; 121(6):1500-9.
94. Karpe PA, Tikoo K. Heat shock prevents insulin resistance-induced vascular complications by augmenting angiotensin-(1-7) signaling. *Diabetes*. 2014 Mar;63(3):1124-39. doi: 10.2337/db13-1267.
95. Karpuzoglu E, Ahmed SA. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. *Nitric Oxide* 15 (2006) 177–186 doi:10.1016/j.niox.2006.03.009
96. Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*. 2008 Mar 7;132(5):818-31. doi:10.1016/j.cell.2007.12.040.
97. Ken L. Chambliss, Ivan S. Yuhanna, Chieko Mineo, Pingsheng Liu, Zohre German, Todd S. Sherman, Michael E. Mendelsohn, Richard G.W. Anderson, Philip W. Shaul. Estrogen Receptor α and Endothelial Nitric Oxide Synthase Are Organized Into a Functional Signaling Module in Caveolae *Circulation Research*.2000; 87: e44-e52doi: 10.1161/01.RES.87.11.e44
98. Kim G, Meriin AB, Gabai VL, Christians E, Benjamin I, Wilson A, Wolozin B, Sherman MY. The heat shock transcription factor Hsf1 is downregulated in DNA damage-associated senescence, contributing to the maintenance of senescence phenotype. *Aging Cell*. 2012 Aug;11(4):617-27. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00827.x.
99. Kim HJ, Oh YK , Lee JS , Lee1 D-Y , Choi1 D , Yoon B-K. Effect of Transdermal Estrogen Therapy on Bone Mineral Density in Postmenopausal Korean Women. *J Menopausal Med* 2014; 20:111-117.
100. Kim JH, Cho HT, Kim YJ. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. *Endocr J*. 2014; 61(11):1055-67.

101. Kitada M, Koya D. SIRT1 in Type 2 Diabetes: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Diabetes Metab J.* 2013 Oct;37(5):315-325.
102. Knapp RT, Wong MJ, Kollmannsberger LK, Gassen NC, Kretzschmar A, Zschocke J, Hafner K, Young JC, Rein T (2014) Hsp70 cochaperones HspBP1 and BAG-1M differentially regulate steroid hormone receptor function. *PLoS One* 9(1):e85415. doi: 10.1371/journal.pone.0085415. eCollection 2014.
103. Knowlton AA, Sun L. Heat shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat shock protein expression in the heart. *Am J Physiol.* 2001;280:H455–H464.
104. Knowlton AA. NF κ B, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation. *Cardiovasc Res.* 2006 Jan;69(1):7-8.
105. Kolberg A, Rosa TG, Puhl MT, Scola G, da Rocha Janner D, Maslinkiewicz A, Lagranha DJ, Heck TG, Curi R and de Bittencourt PI, Jr. (2006) Low expression of MRP1/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumour-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. *Cell Biochem Funct* 24:23-39. doi: 10.1002/cbf.1290
106. Koot RW, Amelink GJ, Blankenstein MA, and Baer PR. Tamoxifen and oestrogen both protect the rat muscle against physiological damage. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 40: 689–695.
107. Krause M, Keane K, Rodrigues-Krause J, Crognale D, Egan B, De Vito G, Murphy C, Newsholme P. Elevated levels of extracellular heat-shock protein 72 (eHSP72) are positively correlated with insulin resistance in vivo and cause pancreatic β -cell dysfunction and death in vitro. *Clin Sci (Lond).* 2014 May;126(10):739-52. doi: 10.1042/CS20130678.
108. Krause MS, Bock PM, Takahashi HK, Homem de Bittencourt PI Jr., Newsholme P. (2015) The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes. *Clin Sci.*, vol.000(0):0-00 cs20140695; doi: 10.1042/CS20140695
109. Krause MS, Heck TG, Bittencourt A., Scomazzon SP, Newsholme P, Curi R, Homem de Bittencourt PI Jr. (2015a) The chaperone balance hypothesis: The importance of the Extracellular to Intracellular HSP70

- Ratio (eHSP70/iHSP70) to inflammation-driven Type 2 Diabetes, the effect of exercise and the implications for clinical management. *Mediat Inflamm* 2015;249205. doi: 10.1155/2015/249205. Epub 2015 Feb 12.
110. Krause MS, Nakajima ST (2015) Hormonal and Nonhormonal Treatment of Vasomotor Symptoms. *Obstet Gynecol Clin North Am* 42(1):163-179. doi: 10.1016/j.ogc.2014.09.008
111. Krause MS, Oliveira Jr LP, Silveira EM, Vianna DR, Rossato JS, Almeida BS, et al. MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells? *Cell Biochem Funct* 2007;25:23–32.
112. Krause MS, Oliveira Jr LP, Silveira EM, Vianna DR, Rossato JS, Almeida BS, et al. MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells?. *Cell Biochem Funct* 2007; 25:23–32.
113. Krebs CJ, Jarvis ED, Pfaff DW. The 70-kDa heat shock cognate protein (Hsc73) gene is enhanced by ovarian hormones in the ventromedial hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 16: 96(4): 1686-91.
114. Kurucz I, Morva A, Vaag A, Eriksson KF, Huang X, Groop L, Koranyi L. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes*. 2002 Apr;51(4):1102-9.
115. Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, Shong M, Ku BJ, Jo EK. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2013 Jan;62(1):194-204. doi: 10.2337/db12-0420.
116. Levin TC, Wickliffe KE, Leppla SH, Moayeri M. Heat shock inhibits caspase-1 activity while also preventing its inflammasome-mediated activation by anthrax lethal toxin. *Cell Microbiol*. 2008 Dec;10(12):2434-46. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01220.x.
117. Li G, Zhang P, Wang J, An Y, Gong Q, Gregg EW, Yang W, Zhang B, Shuai Y, Hong J, Engelgau MM, Li H, Roglic G, Hu Y, Bennett PH. Cardiovascular mortality, all-cause mortality, and diabetes incidence after lifestyle intervention for people with impaired glucose tolerance in

- the Da Qing Diabetes Prevention Study: a 23-year follow-up study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014 Apr 3. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70057-9
118. Li H, Liu L, Xing D, Chen WR. Inhibition of the JNK/Bim pathway by Hsp70 prevents Bax activation in UV-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 2010 Nov 19;584(22):4672-8. doi: 10.1016/j.febslet.2010.10.050.
 119. Lindquist S and Craig EA. The Heat-Shock Proteins. *Annual Review of Genetics* 1988; 22:631-677.
 120. Liu DJ, Hammer D, Komlos D, Chen KY, Firestein BL, Liu AY. SIRT1 Knockdown Promotes Neural Differentiation and Attenuates the Heat Shock Response. *J Cell Physiol.* 2014 Jan 17. doi: 10.1002/jcp.24556.
 121. Lomax P, Schönbaum E. Postmenopausal hot flushes and their management. *Pharm Ther* 1993; 57:347–58.
 122. Lu X and Kakkar V. The Role of Heat Shock Protein (HSP) in Atherosclerosis: Pathophysiology and Clinical Opportunities. *Current Medicinal Chemistry* 2010; 17: 957-973.
 123. Lu X and V. Kakkar. The Role of Heat Shock Protein (HSP) in Atherosclerosis: Pathophysiology and Clinical Opportunities *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17, 957-973
 124. Ludwig MS, Minguetti-Câmara VC, Heck TG, Scmazzon SP, Nunes PR, Bazotte RB, Homem de Bittencourt PI Jr. (2014). Short-term but not long-term hypoglycaemia enhances plasma levels and hepatic expression of HSP72 in insulin-treated rats: an effect associated with increased IL-6 levels but not with IL-10 or TNF α . *Mol. Cell. Biochem.*, 397(1): 97-107; DOI: 10.1007/s11010-014-2176-2.
 125. Maier NK, Crown D, Liu J, Leppla SH, Moayeri M. Arsenic trioxide and other arsenical compounds inhibit the NLRP1, NLRP3, and NAIP5/NLRC4 inflammasomes. *J Immunol.* 2014 Jan 15;192(2):763-70. doi: 10.4049/jimmunol.1301434. Epub 2013 Dec 13.
 126. Mao K, Chen S, Chen M, Ma Y, Wang Y, Huang B, He Z, Zeng Y, Hu Y, Sun S, Li J, Wu X, Wang X, Strober W, Chen C, Meng G, Sun B. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Res.* 2013 Feb;23(2):201-12. doi: 10.1038/cr.2013.6.

127. Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. *Curr Genomics* 2006; 7(8):497–508.
128. Marklund S, Marklung G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47:469-474.
129. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, Becker C, Franchi L, Yoshihara E, Chen Z, Mullooly N, Mielke LA, Harris J, Coll RC, Mills KH, Mok KH, Newsholme P, Nuñez G, Yodoi J, Kahn SE, Lavelle EC, O'Neill LA. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nat Immunol.* 2010 Oct;11(10):897-904. doi: 10.1038/ni.1935.
130. Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics* 2007;62(1):77-86.
131. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):428-35. doi: 10.1038/nature07201.
132. Meldrum DR, Wang M, Tsai BM, et al. Intracellular signaling mechanisms of sex hormones in acute myocardial inflammation and injury. *Frontiers in Bioscience* 2005; 10: (2) 1835–1867.
133. Mendelsohn ME and Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340: 1801–1811, 1999.
134. Meyer MR, Fredette NC, Howard TA, Hu C, Ramesh C, Daniel C, Amann K, Arterburn JB, Barton M, Prossnitz ER. G protein-coupled estrogen receptor protects from atherosclerosis. *Sci Rep* 2014; 23: 4:7564.
135. Milne KJ, Thorp DB, Melling CW, Noble EG (2006) Castration inhibits exercise-induced accumulation of Hsp70 in male rodent hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(4):H1610-6.
136. Moggs JG, Orphanides G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep* 2001; 2(9):775-81.
137. Moggs JG, Orphanides G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep* 2001; 2(9):775-81.

138. Monteiro R, Teixeira D, Conceição Calhau. Estrogen Signaling in Metabolic Inflammation. *Mediators of Inflammation* Volume 2014 (2014), Article ID 615917, 20 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/615917>
139. Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Senese R, Cioffi F, Goglia F, Lanni A, de Lange P. PPARs: Nuclear Receptors Controlled by, and Controlling, Nutrient Handling through Nuclear and Cytosolic Signaling. *PPAR Res.* 2010;2010. pii:435689. doi: 10.1155/2010/435689
140. Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Dev* 1998; 12:3788-96.
141. Morimoto, R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*, v. 12, n. 24, p. 3788-96, Dec 15 1998.
142. Morrison JH,¹ Roberta D. Brinton,² Peter J. Schmidt,³ and Andrea C. Gore⁴ Estrogen, Menopause, and the Aging Brain: How Basic Neuroscience Can Inform Hormone Therapy in Women. *Journal of Neuroscience*, October 11, 2006 • 26(41):10332–10348
143. Mueck AO, Seeger H, Wallwiener D. Medroxyprogesterone acetate versus norethisterone: effect on estradiol-induced changes of markers for endothelial function and atherosclerotic plaque characteristics in human female coronary endothelial cell cultures. *Menopause* 2002; 9: 273-281.
144. Mukhopadhyay I, Nazir A, Saxena DK, and Chowdhuri DK. Heat Shock Response: hsp70 in Environmental Monitoring. *J Biochem Molecular Toxicology* 2003; 17, 5 – 249-54.
145. Nadeau D, Corneau S, Plante I, Morrow G, Tanguay RM. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Stress & Chaperones* 2001; 6 (2):153–163.
146. Newsholme P and Homem de Bittencourt PI, Jr. The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2014; 17:295-305. doi: 10.1097/MCO.0000000000000077

147. Nollen EA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing “heat shock” proteins. *J Cell Sci* 2002; 115:2809–2816
148. Nollen EA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing “heat shock” proteins. *J Cell Sci* 2002; 115:2809–2816
149. North American Menopause Society: Treatment of menopause-associated vasomotor symptoms: Position statement. *Menopause* 2004; 2:11–33.
150. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Oct;1(4):a000034. doi: 10.1101/cshperspect.a000034.
151. Padmini E, Uthra V, Lavanya S. Effect of HSP70 and 90 in modulation of JNK, ERK expression in preeclamptic placental endothelial cell. *Cell Biochem Biophys.* 2012 Dec;64(3):187-95. doi: 10.1007/s12013-012-9371-0.
152. Papaconstantinou AD, Fisher BR, Umbreit TH, Goering PL, Lappas NT, Brown KM (2001) Effects of beta-estradiol and bisphenol A on heat shock protein levels and localization in the mouse uterus are antagonized by the antiestrogen ICI 182,780. *Toxicol Sci* 63(2):173-80.
153. Paroo Z, Dipchand ES, Noble EG. Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282(2):C245-51.
154. Patel B, Khaliq A, Jarvis-Evans J, Boulton M, Arrol S, Mackness M, et al. Hypoxia induces HSP 70 gene expression in human hepatoma (HEP G2) cells. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 36:907–12.
155. Pellegrini M; Bulzomi P; Galluzzo P; Lecis M; Leone S; Pallottini V; Maria Marino. Naringenin modulates skeletal muscle differentiation via estrogen receptor α and β signal pathway regulation. *Genes Nutr* 2014; 9:425.
156. Perillo B, Sasso A, Abbondanza C, Palumbo G. 17 β -Estradiol Inhibits Apoptosis in MCF-7 Cells, Inducing bcl-2 Expression via Two Estrogen-Responsive Elements Present in the Coding Sequence. *Mol Cell Biol* 2000; 20(8):2890–2901.

157. Pockley G, Calderwood SK, Multhoff G. The atheroprotective properties of Hsp70: a role for Hsp70-endothelial interactions? *Cell Stress and Chaperones* 2009; 14:545–553.
158. Politi MC, Schleinitz MD, Col NF. Revisiting the duration of vasomotor symptoms of menopause: a meta-analysis. *J Gen Intern Med* 2008 ;23:1507–13
159. Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med* 2003; 228:111–133
160. Rajamäki K, Lappalainen J, Oörni K, Välimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, Eklund KK. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One*. 2010 Jul 23;5(7):e11765. doi: 10.1371/journal.pone.0011765.
161. Rapp PR, Morrison JH, Roberts JA (2003a) Cyclic estrogen replacement improves cognitive function in aged ovariectomized rhesus monkeys. *J Neurosci* 23:5708 –5714s).
162. Raynes R, Leckey BD Jr, Nguyen K, Westerheide SD. Heat shock and caloric restriction have a synergistic effect on the heat shock response in a sir2.1-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 2012 Aug 17;287(34):29045-53. doi: 10.1074/jbc.M112.353714.
163. Raynes R, Pombier KM, Nguyen K, Brunquell J, Mendez JE, Westerheide SD (2013) The SIRT1 modulators AROS and DBC1 regulate HSF1 activity and the heat shock response. *PLoS One*, 8(1):e54364. doi: 10.1371/journal.pone.0054364.
164. Richard I. Morimoto. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Dev*. 1998. 12:3788-3796 doi:10.1101/gad.12.24.3788
165. Richard V, Kaeffer N, Thuillez C. Delayed protection of the ischemic heart – from pathophysiology to therapeutic applications. *Fundam Clin Pharmacol* 1996;10:409–15
166. Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571-573.

167. Rius B, López-Vicario C, González-Pérez A, Morán-Salvador E, García-Alonso V, Clària J, Titos E. Resolution of inflammation in obesity-induced liver disease. *Front Immunol.* 2012 Aug 20;3:257. doi: 10.3389/fimmu.2012.00257.
168. Rodrigues-Krause J, Krause M, O'Hagan C, De Vito G, Boreham C, Murphy C, Newsholme P and Colleran G (2012) Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? *Cell Stress Chaperones* 17:293-302. doi: 10.1007/s12192-011-0319-x
169. Rossato JS, Krause MS, Fernandes AJ, Fernandes JR, Seibt IL, Rech A, Homem de Bittencourt PI Jr. (2014) Role of alpha- and beta-adrenoreceptors in rat monocyte/macrophage function at rest and acute exercise. *J Physiol Biochem* 70(2):363-74. doi: 10.1007/s13105-013-0310-3
170. Rossi A, Coccia M, Trotta E, Angelini M, Santoro MG. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by heat: a novel aspect of heat shock factor 1 function in human cells. *PLoS One.* 2012;7(2):e31304. doi: 10.1371/journal.pone.0031304.
171. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):103-8.
172. Russell KS, Haynes MP, Caulin-Glaser T, Rosneck J, Sessa WC, Bender J. Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. Effects on calcium sensitivity and NO release. *J Biol Chem.* 2000; 275:5026–5030.
173. Sack MN, Rader DJ, Cannon RO. Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* 1994; 343:269-270.
174. Sack MN, Rader DJ, Cannon RO. Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* 1994; 343:269-270.
175. Saha JK, Xia J, Grondin JM, Engle SK and Jakubowski JA (2005) Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp Biol Med* (Maywood) 230:777-84.

176. Said Ali K, Ferencz A, Nemcsok J, Hermes E. Expressions of heat shock and metallothionein genes in the heart of common carp (*Cyprinus carpio*): effects of temperature shock and heavy metal exposure. *Acta Biol Hung* 2010;61:10–23.
177. Said Ali K, Ferencz A, Nemcsok J, Hermes E. Expressions of heat shock and metallothionein genes in the heart of common carp (*Cyprinus carpio*): effects of temperature shock and heavy metal exposure. *Acta Biol Hung* 2010; 61:10–23.
178. Schacter JL, Henson ES, Gibson SB. Estrogen Regulation of Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Member Mcl-1 Expression in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 2014; 9(6): e100364. doi:10.1371/journal.pone.0100364
179. Schalla WO, Arko RJ, Thompson SE (1984). Evaluation of a C-Reactive Protein Latex Agglutination Detection Test with Sera from Patients with Sexually Transmitted Diseases. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 20 (6): 1171-1173.
180. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):821-32. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040.
181. Serhan CN. The resolution of inflammation: the devil in the flask and in the details. *FASEB J*. 2011 May;25(5):1441-8. doi: 10.1096/fj.11-0502ufm.
182. Sharron H. Francis, Jennifer L. Busch, and Jackie D. Corbin. cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacological Reviews* 2010; 62: 3525-563.
183. Singh IS, Hasday JD (2013) Fever, hyperthermia and the heat shock response. *Int J Hyperthermia* 29(5):423-35. doi: 10.3109/02656736.2013.808766.
184. Singh IS, He JR, Calderwood S, Hasday JD. A high affinity HSF-1 binding site in the 5'-untranslated region of the murine tumor necrosis factor- α gene is a transcriptional repressor. *J Biol Chem* 2002; 277:4981–4988.
185. Sobrino A, Oviedo PJ, Novella S, Laguna-Fernandez A, Bueno C, Garcia-Perez MA, Tarin JJ, Cano A, Hermenegildo C. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor. *J. Mol. Endocrinol* 2010; 44: 237-246.

186. Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W, et al. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Fertility and Sterility* 2001; 76 (5): 874-78.
187. Sowers MFR, Zheng H, McConnell D, Nan B, Harlow S and Randolph Jr JF. Follicle Stimulating Hormone and Its Rate of Change in Defining Menopause Transition Stages. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:3958–64.
188. Soyduñç S , Ahmet Çelik² , Seniz Demiryürek³ , Vedat Davutođlu¹ , Mehmet Tarakçiođlu² , Mehmet Aksoy¹. THE RELATIONSHIP BETWEEN OXIDATIVE STRESS, NITRIC OXIDE, AND CORONARY ARTERY DISEASE. *Eur J Gen Med* 2007;4(2):62-66
189. Stearns V, Ullmer L, López JF, Smith Y, Isaacs C, Hayes D (2002) Hot flushes. *Lancet* 360:1851-1861.
190. Stearns V¹, Ullmer L, López JF, Smith Y, Isaacs C, Hayes D. Hot flushes. *Lancet*. 2002 Dec 7;360(9348):1851-61.
191. Stice JP and Knowlton AA. Estrogen, NFκB, and the Heat Shock Response. *Mol Med* 2008; 14(7-8): 517–527.
192. Stice JP and Knowlton AA. Estrogen, NFκB, and the Heat Shock Response. *Mol Med* 2008; 14(7-8): 517–527.
193. Stice JP, Knowlton AA (2008) Estrogen, NF-κB, and the heat shock response. *Mol Med* 14(7-8):517-27. doi: 10.2119/2008-00026.
194. Stice JP, Chen L, Kim S-C, Jung JS, Tran AL, Liu TT, Knowlton AA. 17β-Estradiol, Aging, Inflammation, and the Stress Response in the Female Heart. *Endocrinology* 2011; 152(4): 1589–1598.
195. Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, Rensen PC, Voshol PJ, Fantuzzi G, Hijmans A, Kersten S, Müller M, van den Berg WB, van Rooijen N, Wabitsch M, Kullberg BJ, van der Meer JW, Kanneganti T, Tack CJ, Netea MG. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab*. 2010 Dec 1;12(6):593-605. doi: 10.1016/j.cmet.2010.11.011.
196. Stienstra R, Tack CJ, Kanneganti TD, Joosten LA, Netea MG. The inflammasome puts obesity in the danger zone. *Cell Metab*. 2012 Jan 4;15(1):10-8. doi: 10.1016/j.cmet.2011.10.011.

197. Storti S, Vittorini S, Iacone MR et al. Analysis of the variation in the hsp70-1 and hsp90alpha mRNA expression in human myocardial tissue that has undergone surgical stress. *Cell Stress Chaperones* 2003; 8:(1)18–25.
198. Subbiah MTR, Kessel B, Agrawal M, Rajan R, Abplanalp W, Rymaszewski Z. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1095-97.
199. Swindell WR, Masternak MM, Kopchick JJ, Conover CA, Bartke A, Miller RA. "Endocrine regulation of heat shock protein mRNA levels in long-lived dwarf mice," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 130, no. 6, pp. 393–400, 2009.
200. Swindell WR, Masternak MM, Kopchick JJ, Conover CA, Bartke A, Miller RA. Endocrine regulation of heat shock protein mRNA levels in long-lived dwarf mice. *Mechanisms of Ageing and Development* 2009; 130:(6)393–400.
201. Takahashi S, Mendelsohn ME. Synergistic Activation of Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of AN HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem*. 2003;278:30821–30827.
202. Talwar S, Jin J, Carroll B, Liu A, Gillespie MB, Palanisamy V. Caspase-mediated cleavage of RNA-binding protein HuR regulates c-Myc protein expression after hypoxic stress. *J Biol Chem*. 2011 Sep 16;286(37):32333-43. doi: 10.1074/jbc.M111.255927.
203. Tang S, Buriro R, Liu Z, Zhang M, Ali I, Adam A, Hartung J, Bao E. Localization and expression of Hsp27 and α B-crystallin in rat primary myocardial cells during heat stress in vitro. *PLoS One*. 2013 Jul 19;8(7):e69066. doi: 10.1371/journal.pone.0069066.
204. Tataryn IV, Meldrum DR, Lu KH, Frumar AM, Judd LH, FSH, and skintemperature during menopausal hot flush, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49 (1979)152–154.
205. Tchkonian T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scoble H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010 Oct;9(5):667-84. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00608.x

206. Tchkonja T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2013 Mar 1;123(3):966-72. doi: 10.1172/JCI64098. •This is a very comprehensive review article on cell senescence and senescence-associated secretory phenotype, which eternalizes inflammation.
207. Tuomikoski P, Ebert P, Groop PH, Haapalahti P, Hautamäki H, Rönneck M, Ylikorkala O, Mikkola TS. Evidence for a role of hot flushes in vascular function in recently postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 2009;113(4):902-8.
208. Utian WH. Psychosocial and socioeconomic burden of vasomotor symptoms in menopause: a comprehensive review. *Health and Quality of Life Outcomes* 2005; 3: 47.
209. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med.* 2011 Feb;17(2):179-88. doi: 10.1038/nm.2279.
210. Velarde MC. Pleiotropic actions of estrogen: a mitochondrial matter. *Physiol. Genomics* 2013; 45:106-109 doi:10.1152/physiolgenomics.00155.2012
211. von Roretz C, Lian XJ, Macri AM, Punjani N, Clair E, Drouin O, Dormoy-Raclet V, Ma JF, Gallouzi IE. Apoptotic-induced cleavage shifts HuR from being a promoter of survival to an activator of caspase-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 2013 Jan;20(1):154-68. doi: 10.1038/cdd.2012.111.
212. Voss MR, Stallone JN, Li M, Cornelussen RN, Knuefermann P, Knowlton AA (2003) Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(2):H687-92.
213. Wang CY, Kim HH, Hiroi Y, Sawada N, Salomone S, Benjamin LE, Walsh K, Moskowitz MA, Liao JK. Obesity increases vascular senescence and susceptibility to ischemic injury through chronic activation of Akt and mTOR. *Sci Signal.* 2009 Mar 17;2(62):ra11. doi: 10.1126/scisignal.2000143.

214. Wang W, Yang X, López de Silanes I, Carling D, Gorospe M. Increased AMP:ATP ratio and AMP-activated protein kinase activity during cellular senescence linked to reduced HuR function. *J Biol Chem.* 2003 Jul 18;278(29):27016-23.
215. Wassmann S, Bäumer AT, Strehlow K, van Eickels M, Grohé C, Ahlbory K, Rösen R, Böhm M, Nickenig G (2001) Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 103(3):435-41.
216. Wen H, Ting JP, O'Neill LA. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases--did Warburg miss inflammation? *Nat Immunol.* 2012 Mar 19;13(4):352-7. doi: 10.1038/ni.2228.
217. Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM Jr, Sistonen L, Morimoto RI. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science.* 2009 Feb 20;323(5917):1063-6. doi: 10.1126/science.1165946. Erratum in: *Science.* 2013 Nov 22;342(6161):931.
218. WHO Scientific Group on Research on the Menopause in the 1990s. Geneva, WHO technical report series; 866,1-107, 1996.
219. Wick G, Bojana Jakic, Maja Buszko, Marius C. Wick and Cecilia Grundtman The role of heat shock proteins in atherosclerosis *Nat. Rev. Cardiol.* 2014; 11: 516–529 [doi:10.1038/nrcardio.2014.91](https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.91);
220. Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J.* 2002 Jul;16(9):935-42.
221. Williams BA, Kay RF, Kirk EC. New perspectives on anthropoid origins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar 16;107(11):4797-804. doi: 10.1073/pnas.0908320107.
222. Wrangham R. *Catching Fire: How Cooking Made Us Human.* Basic Books: New York, 2009, 309 pp., ISBN 978-0-465-01362-3.
223. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (WHI). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA* 2002; 288:321-33

224. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA* 2002; 288:321-33
225. Wu L, Hu C, Huang M, Jiang M, Lu L, Tang J. Heat shock transcription factor 1 attenuates TNF α -induced cardiomyocyte death through suppression of NF κ B pathway. *Gene*. 2013 Sep 15;527(1):89-94. doi: 10.1016/j.gene.2013.05.024. Epub 2013 Jun 12.
226. Xing D, Oparil S, Yu H, Gong K, Feng W, Black J, Chen YF, Nozell S (2012) Estrogen modulates NF κ B signaling by enhancing I κ B α levels and blocking p65 binding at the promoters of inflammatory genes via estrogen receptor- β . *PLoS One* 7(6):e36890. doi: 10.1371/journal.pone.0036890
227. Zhao W, An H, Zhou J, Xu H, Yu Y, Cao X. Hyperthermia differentially regulates TLR4 and TLR2-mediated innate immune response. *Immunol Lett*. 2007 Feb 15;108(2):137-42.
228. Zhong Chen,¹ Ivan S. Yuhanna,¹ Zoya Galcheva-Gargova,² Richard H. Karas,² Michael E. Mendelsohn,² and Philip W. Shaul. Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen *J Clin Invest*. 1999 Feb 1; 103(3): 401–406. doi: 10.1172/JCI5347
229. Zou W (2011) Ovariectomy (oophorectomy) *Protoc Exch*. doi:10.1038/protex.2011.242

ANEXO I – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA *MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY*: *Estrogen deprivation does not affect vascular heat shock response in female rats: a comparison with oxidative stress markers*

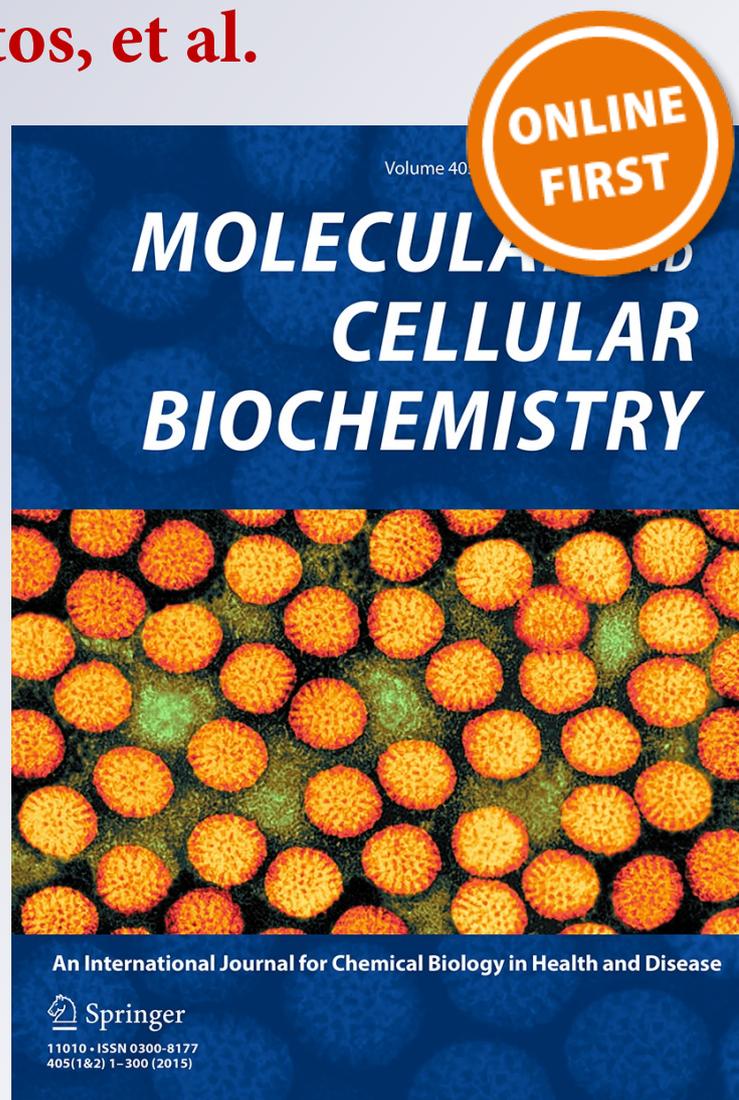
*Estrogen deprivation does not affect
vascular heat shock response in female rats:
a comparison with oxidative stress markers*

**Antônio Azambuja Miragem, Mirna
Stela Ludwig, Thiago Gomes Heck,
Fernanda Giesel Baldissera, Analu
Bender dos Santos, et al.**

Molecular and Cellular Biochemistry
An International Journal for Chemical
Biology in Health and Disease

ISSN 0300-8177

Mol Cell Biochem
DOI 10.1007/s11010-015-2472-5



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Estrogen deprivation does not affect vascular heat shock response in female rats: a comparison with oxidative stress markers

Antônio Azambuja Miragem^{1,2} · Mirna Stela Ludwig^{3,4} · Thiago Gomes Heck^{3,4} ·
Fernanda Giesel Baldissera³ · Analu Bender dos Santos^{3,4} · Matias Nunes Frizzo^{3,4} ·
Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.¹

Received: 27 February 2015 / Accepted: 30 May 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Hot flashes, which involve a tiny rise in core temperature, are the most common complaint of peri- and post-menopausal women, being tightly related to decrease in estrogen levels. On the other hand, estradiol (E2) induces the expression of HSP72, a member of the 70 kDa family of heat shock proteins (HSP70), which are cytoprotective, cardioprotective, and heat inducible. Since HSP70 expression is compromised in age-related inflammatory diseases, we argued whether the capacity of triggering a robust heat shock (HS) response would be still present after E2 withdrawal. Hence, we studied the effects of HS treatment (hot tub) in female Wistar rats subjected to bilateral ovariectomy (OVX) after a 7-day washout period. Twelve h after HS, the animals were killed and aortic arches were surgically excised for molecular analyses. The results were compared with oxidative stress markers in the plasma (superoxide dismutase, catalase, and lipoperoxidation) because HSP70 expression is also sensitive to redox regulation. Extracellular (plasma) to intracellular HSP70 ratio, an index of systemic inflammatory status, was also investigated. The results showed that HS response was

preserved in OVX animals, as inferred from HSP70 expression (up to 40 % rise, $p < 0.01$) in the aortas, which was accompanied by no further alterations in oxidative stress, hematological parameters, and glycemic control either. This suggests that the lack of estrogen per se could not be solely ascribed as the unique source of low HSP70 expression as observed in long-term post-menopausal individuals. As a consequence, periodic evaluation of HSP70 status (iHSP70 vs. eHSP70) may be of clinical relevance because decreased HS response capacity is at the center of the onset of menopause-related dysfunctions.

Keywords Heat shock proteins · HSP70 · Estrogen deprivation · Menopause · Stress response

Abbreviations

HS Heat shock
HSP70 The 70 kDa family of heat shock proteins
E2 Estradiol

Introduction

Although hot flashes are the most common complaint of peri- and post-menopausal women, the pathophysiology of this very uncomfortable symptom is greatly unknown. In fact, little was added to our knowledge on hot flashes as compared to that of more than 10 years ago (please, see [1] for review). Animal and human studies suggest that estrogen withdrawal affects the thermoregulatory set point in the anterior hypothalamus [1, 2]. Interestingly, ovariectomized rats without estrogen replacement have shown a shift in the thermoneutral zone to lower ambient temperatures [2]. On the other hand, a solid body of evidence indicates that the

✉ Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.
pauloivo@ufrgs.br

¹ Laboratory of Cellular Physiology, Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, ICBS, 2° andar, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil
² Federal Institute of Education, Science and Technology “Farroupilha”, Santa Rosa, RS, Brazil
³ Department of Life Sciences, Regional University of the Northwest of Rio Grande do Sul State, Ijuí, RS, Brazil
⁴ Postgraduate Program in Integral Attention to Health (PPGAIS-UNIJUI/UNICRUZ), Ijuí, RS, Brazil

principal mammalian estrogen, 17 β -estradiol (E2), induces the expression of HSP72, a member of (HSP70) [3–6], which consists in a molecular chaperone whose expression is highly induced by heat.

Although HSPs were named after the observation that heat-shocked *Drosophila busckii* cells strongly expressed this class of proteins [7], HSP70 expression is associated with other homeostatically stressful situations, not only heat [8, 9]. Accordingly, the heat shock (HS) response is observed during physical exercise and inflammation eventually leading to a robust expression of HSP70.

During the establishment of an inflammatory response (including its resolution phase), it is observed a finely orchestrated expression of inducible enzymes (including cyclo-oxygenase-2) that drive the synthesis of prostaglandin E₂ (PGE₂) which induces fever by upwardly changing the body temperature set point. As a consequence, the highly evolutionarily conserved HS response initiates the activation of a transcriptional program based on the activation of heat shock transcription factor-1 (HSF1) [10]. The principal impact of HSF1 activation is the elevated production of the HS proteins whose major representative is HSP70. Small HS proteins induced by fever, such as HSP27, also contribute to cytoprotection [11, 12]. Heat stress will then stimulate HSF1-induced HSP70 expression, thereby protecting cells against proteotoxic stress, and therefore, the HS response supports proteostasis (protein homeostasis) and cytoprotection [13]. Please, see [14] for review.

Consequently, inasmuch as E2 is a physiological inducer of HS response, it is plausible to suppose that some E2-based protective effects could be related to the anti-inflammatory action of E2-elicited HSP70 expression. In fact, E2-elicited expression of HSP70 may be related to the well-known cardioprotective effect of estrogens, whereas E2 is able to protect rat cardiomyocytes against hypoxia-induced injury, via the expression of HSP70 [3], an observation that seems to be mainly related to females [15], although castration may inhibit exercise-induced expression of HSP70 in the hearts of male rats due to the absence of androgen action on the heart muscle [16]. It has also been demonstrated that early E2-dependent induction of HSP70 occurs via the sequential activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) and HSF1 [3–5]. Moreover, E2 effects on HSP70 expression is mediated by estrogen receptors [17], particularly of α -type [18], whereas the xenoestrogen bisphenol A, which evokes several responses in the reproductive tract and neuroendocrine axis of rodents [19], is also an HSP70 inducer [17]. Conversely, HSP70 co-chaperones regulate steroid hormone receptor function [20]. However, there is no evidence on the effects of E2 over the HS response or HSP70 biochemical pathway itself.

Hence, we conjectured that hot flashes could be a physiological response of the hypothalamus to the absence of a HSP70-inducing factor: E2. This led us to investigate whether HS response might be preserved in the absence of E2, so that castration would be able to interfere in HSP70 expression induced by heat treatment in female rats. Moreover, since HSF1 activation is redox-regulated due to the presence of the highly conserved cysteines C35 and C105 [21], we argued whether any alteration in HS response induced by the absence of estrogen could be related to alterations in antioxidant enzymes and oxidative stress markers.

Materials and methods

Materials

All the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) unless otherwise stated.

Animals

Adult (7-month old) female Wistar rats (total $n = 38$), weighing 250–300 g, from the Federal University of Rio Grande do Sul Institute of Basic Health Sciences Animal Care Facility (CREAL) were used in this study. The rats were maintained under constant temperature (24 ± 1 °C) with automatically controlled photoperiod (12 h light/12 h dark; lights on at 7:00 a.m.) and 60 % relative humidity. A standard commercial laboratory diet (Nuvilab[®], Curitiba, Brazil) and water were given ad libitum during the experimental procedures. All the procedures performed in studies involving animals followed the ethical rules established by Arouca's Act (Federal Law 11794/2008) and the Guide for Care and Use of Experimental Animals published by the National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised in 1996). The procedures were approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA #19858), according to the guidelines of the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Ovariectomy

Bilateral removal of rat ovaries were conducted basically as described in [22], except that ketamine (100 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) were used for anesthesia. After surgery, the animals were submitted to a 7-day washout period to allow for the vanishing of estrogen effects. Control animals were sham-operated. Effectiveness of ovariectomy (OVX) was checked by measuring total plasma 17 β -E2 (below the

detection limit of 11.8 pg/mL; ADVIA Centaur XP eE2 chemiluminescent immunoassay in a Siemens Healthcare Diagnostics system) 1 week after the surgical procedure. It is important to underline that the experimental design (a short 7-day period of E2 deprivation) was conceived exactly to allow the discrimination between direct estrogen effects from those which could be a simple consequence of long-term absence of estrogens, such as oxidative-stress dependent endothelial dysfunctions, and vascular senescence, as we shall discuss later herein.

Heat treatment

In order to evaluate whether the capacity of the animals to present a classical HS response (robust HSP70 expression disseminated throughout body tissues) after heat exposure was preserved after estrogen ablation, the rats were anesthetized with 100 mg/kg sodium pentobarbital (which minimally interferes in glycemic studies) after the washout period and treated as described in [23] with slight modifications. Anesthesia impairs the arrival of thermoreceptor impulses to thermoregulatory nuclei of hypothalamus so that animal core temperature is completely dependent on external temperature. Afterwards, the rats were bathed in a rodent hot tub containing water at 42 °C having the core

temperature monitored with a rectal probe (Minipa, MT-401A). After reaching rectal temperature of 41 °C, animals were maintained in the bath for exact 15 min having temperature stabilized between 41 and 41.7 °C. For sham treatment, the rats were anesthetized but core temperature was maintained as 37 °C by means of a 36 °C water bath under the same above conditions. After the heat or sham treatment, the rats were administered 0.9 % saline s.c. (2 mL/100 g of body weight) to prevent dehydration. Room temperature was maintained at 27 °C during all the time. Twelve hours after heat treatment (a period of maximal HSP70 expression [9]), the rats were killed by decapitation without anesthesia for tissue excision and blood collection. This method was chosen because it is extremely rapid and does not appreciably interfere in glucose metabolism, which was investigated in the present work. The death of the animals under anesthesia, while desirable, is not compatible with the experimental outcomes because the vast majority of anesthetics commonly used with experimental animals lead to an intense hyperglycemia in rodents [24, 25]. Additionally, such anesthetics interfere with the function of cells involved in the systemic production of HSP70, such as monocytes [26], while HSP70 plasma levels may be completely suppressed by high glucose levels [27]. The present experimental design is illustrated in Fig. 1.

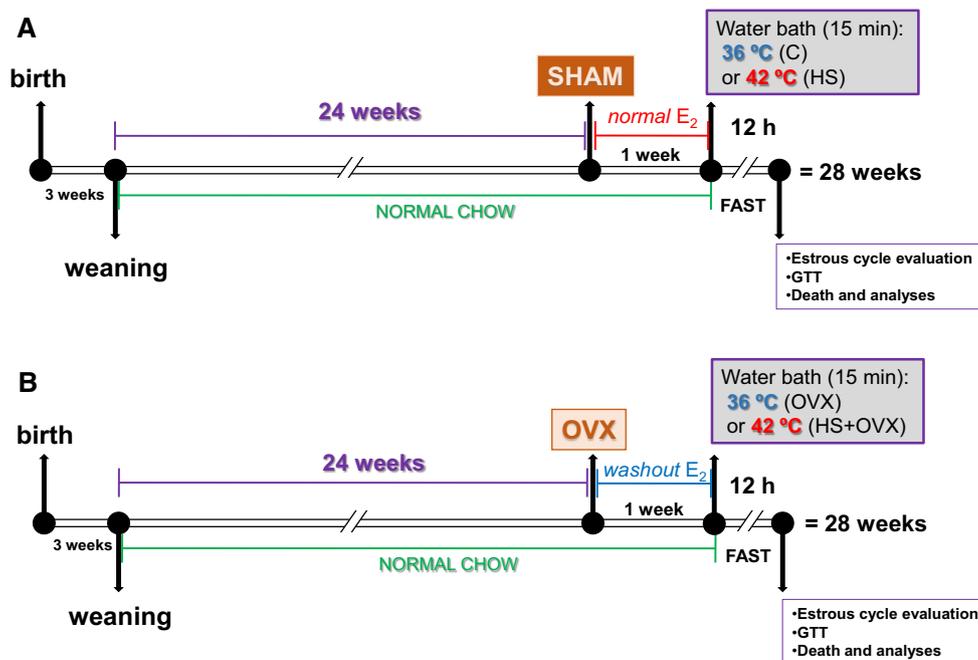


Fig. 1 Study design. Adult (7-month old) female Wistar rats (total $n = 38$) were weaned at 3 weeks of age and maintained under normal dietary schedule for 24 weeks. Afterwards, the animals were sham-operated (a) or submitted to a bilateral removal of the ovaries (b) as described in Methods section. Then, the rats were left to a 1-week estrogen (E2) washout period being separated into 2 subgroups for heat treatment as follows. Sham-operated rats (a) were submitted to a

42 °C water bath heat shock (HS) section for 15 min or maintained at 36 °C (C) for the same period. Identical treatment was deserved to ovariectomized (OVX) rats. After the acute heat treatment, the animals were fasted for an additional 12-h period in order to be finally assessed for estrous cycle evaluation, glucose tolerance test (GTT), and biochemical analyses

Blood and tissue sampling

After decapitation, blood was then immediately collected into heparinized (30 IU/mL final volume) tubes (for redox status and metabolite measurements) or in disodium EDTA (2 mg/mL final volume)—treated tubes (for HSP72 assays). After separation, plasma samples were frozen at -86°C . Since it has been often found a close correlation between extracellular HSP72 and the plasma levels of inflammation-related cytokines [9], we decided to check HSP72 plasma levels, which were assessed by using EKS-715 high-sensitivity HSPA1A-specific ELISA kit (Enzo Life Sciences). Fasting plasma glucose concentrations were spectrophotometrically assessed (Liquiform, Labtest Diagnóstica, Vista Alegre, Brazil). Intraperitoneal glucose tolerance tests (ipGTT) were conducted in a separate set of control and OVX rats 12 h after hot tube sessions. Briefly, a glucose overload of 1 g/kg was i.p. administered to 12-h fasting animals, and 0.6 μL samples were collected from the tail vein every 30 min after glucose injection (time zero) using Abbott lancing device and glucose meter (Diabetes Care Optium Xceed). Glucose samples were harvested up to 120 min after the beginning of the tests, and incremental area under glycemic curve (IAUC, i.e., the AUC calculated by subtracting time zero point from the remaining glycemic values for each group) was obtained for each animal. Hematological parameters were investigated in EDTA-samples in a Horiba ABX Micros 60 Hematology Analyzer (for quantitative cell analyses). Erythrocyte sedimentation rate (Westergren ESR) was performed as described [28]. Plasma C-reactive protein (CRP) levels were also assessed. Soon after blood harvesting, the entire aortic arch of each animal was surgically excised, weighed (approx 20 mg), and immediately freeze-clamped in liquid nitrogen for protein analyses. The scope of this particular investigation was to assess any possible alteration in HSP70 status caused by estrogen deprivation in the main point of atherosclerotic-related diseases in rodents [29]. Tissue samples were stored frozen at -86°C for subsequent analysis.

Determination of sample protein concentrations

Protein concentrations in aorta homogenates and plasma were spectrophotometrically determined by the method of Bradford [30], using bovine serum albumin as standard.

Oxidative stress markers

Lipid peroxidation was assessed by the method of thiobarbituric acid (TBA) reactive substances (TBARS) [31]. Briefly, 50 μL of plasma were precipitated with 10 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA), centrifuged, and incubated

with TBA for 15 min at 100°C . TBARS were extracted using n-butanol (1:1). Afterwards, the absorbance was recorded by spectrophotometry at 535 nm using malondialdehyde standard prepared from 1,1,3,3-tetramethoxypropane. In order to check for any alteration in plasma antioxidant enzyme activities, we evaluated superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in plasma samples spectrophotometrically as follows. SOD activity was measured by the technique of inhibition of pyrogallol auto-oxidation [32], whereas CAT activity was evaluated assessing the decomposition of hydrogen peroxide [33].

Protein separation and detection

In order to examine HSP70 protein expression, small pieces of aorta arch slices (approx 20 mg) were homogenized and processed for sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblot analyses as adapted from elsewhere [34]. Briefly, tissues were homogenized (still frozen) in 5 volumes of 0.1 % (w/v) SDS buffer containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma) consisting of leupeptin (4.2 μM), aprotinin (0.31 μM), tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK, 20 μM), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, 100 μM), sodium orthovanadate (Na_3VO_4 ; 1 mM), sodium molybdate (Na_2MoO_4 ; 1 mM), and β -glycerophosphate (1 mM). Afterwards, homogenates were centrifuged at $16,000\times g$ for 1 min at room temperature and supernatant fractions were saved for protein determination [30]. Then, equivalent amounts of protein from each sample ($\sim 40\ \mu\text{g}$) were mixed with Laemmli's gel loading buffer [50 mM Tris, 10 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) glycerol, 10 % (v/v) 2-mercaptoethanol, and 2 mg/ml bromphenol blue] in a ratio of 1:1, boiled for 5 min, and electrophoresed in a 10 % polyacrylamide minigel for 4 h 15 mA/gel. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (GE HealthCare) according to the electro-transfer (Bio-Rad) manufacturer's instructions (2 h, 100 V) and transferred bands were visualized with 0.3 % (w/v) Red Ponceau S (Sigma) in 3 % (w/v) TCA solution to be photodocumented (ImageQuantTM 350, GE HealthCare). For immunoblotting procedures, SNAP i.d. (Merck Millipore) quick immunoblot vacuum system was used and membranes were washed with water and then blocked in 0.5 % (w/v) non-fat dry milk (Nestlé) in wash buffer [TEN-Tween 20 solution (0.1 % w/v); TEN is 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.4]. Membranes were washed three times with wash buffer and incubated for 10 min with mouse anti-human HSP70 monoclonal antibody (Sigma H5147) which recognizes both the 73-kDa constitutive HSC70 (HSPA8 gene) and the 72-kDa inducible HSP70 (HSPA1A gene) forms, at 1:1000 dilution. After three washings with wash buffer, peroxidase-labeled

rabbit anti-mouse IgG (Sigma A9044) was utilized as secondary antibody, at 1:10,000 dilution. As a gel loading control, peroxidase-labeled mouse anti-human β -actin monoclonal antibody (Sigma A3854) was used at 1:25,000 dilution. Blot visualization was acquired for 600 s using ECL-Prime Western blotting Reagent (GE Healthcare, UK) in ImageQuantTM 350 chemiluminescence system (GE) and accompanying online stacking imaging software ImageQuant TL 7.0 (GE). Data are given as the Mean \pm SEM. of expressions normalized in terms of β -actin.

Statistical analyses

Results were subjected to analysis of variance (ANOVA) to track type I errors after Kolmogorov–Smirnov test for normality. Levene's test was used to detect deviations from homoscedasticity between the test groups. When ANOVA (one way) detected significance, comparisons between time and treatment test groups were made and, whenever P values were less than 0.05, statistically significant differences were identified by the multiple comparison procedure of Tukey–Kramer Multiple Comparisons Test. Frequencies of a tendency to pro-inflammatory states, assessed by plasma CRP, were checked by the Pearson's Chi squared test. All statistical calculations were performed using GraphPad Instat 3.0 software for Windows.

Results

Table 1 shows body weight and core temperature profiles of the animals studied herein. There was no difference in body weight when animals were analyzed at the preoperative, post-washout period (7 days) or in the day of final evaluations (after a 12 h fasting period). In animals submitted to hot tub thermal treatment, core temperature was found to vary from approx 37.3–40.5 °C in both control and OVX females. Thrity min after heat treatment (or

equivalent sham treatment at 37 °C), all the animals showed core temperature oscillating around 34.9 °C during the recovery (from anesthesia) period. Twelve h after hot tub sessions, the animals were killed having blood and aortic arch processed as described in Methods section.

As shown in Fig. 2, 12 h after hot tub session, HSP70 expression in the aortic arch of control animals was enhanced by approx 15 % ($p < 0.05$). However, there was no difference between HSP70 content in the aortas of both OVX rats and their control sham-operated counterparts. On the other hand, OVX animals were still able to present a robust HS response (HSP70 rise by 40 %, $p < 0.01$), which suggests that, although estrogens may sustain hypothalamic thermoneutral temperature at sufficient high levels to avoid rebound hot flushes [2], ablation of estrogen did not modify the capacity of aortic tissue to respond to a heat treatment by increasing HSP70 expression. In other words, the HS response seems to be preserved even in the absence of estrogens.

Recent experimental evidence from our own group as well as studies by others support the finding that the ratio between plasma HSP70 (eHSP70) and tissue intracellular HSP70 (iHSP70) can predict the immunoinflammatory status being of value especially in chronic inflammatory diseases, such as aging-related ones [35]. In fact, changes in magnitude of the ratio $R = [eHSP70]/[iHSP70]$ emerge as a potentially new biomarker for inflammation, and as a very sensitive indicator of inflammatory status [35, 36]. Because of this, we wondered whether OVX could affect HSP70 ratios under control and heat-stimulated conditions. As shown in Table 2, heat treatment induced an expected rise in aortic iHSP70 content (examined after 12 h), in both control and OVX rats ($p = 0.0324$), while no alteration was observed in circulating eHSP70. Hence, no appreciable change in HSP70 ratio was evidenced. This means that short-term OVX did not interfere in immunoinflammatory status of the animals, which was accompanied by no changes in plasma antioxidant enzyme activities and TBARS either (Table 2).

Table 1 Body weight and core temperature of control (C) and ovariectomized (OVX) rats subjected or not to heat shock session (HS and OVX + HS groups)

Variable	Groups			
	C	HS	OVX	OVX + HS
Weights (g)				
Preoperative	217.17 \pm 12.17	226.00 \pm 16.33	230.29 \pm 20.14	221.33 \pm 17.27
Post-washout (7 days)	212.33 \pm 10.65	222.17 \pm 17.38	222.29 \pm 18.87	215.17 \pm 18.45
Post-12-h fasting	208.00 \pm 10.08	219.50 \pm 12.41	215.29 \pm 15.53	210.67 \pm 19.12
Body temp. (°C)				
At rest	37.33 \pm 0.58	37.40 \pm 0.67	37.06 \pm 1.02	37.38 \pm 0.26
End of hot tub session	37.42 \pm 1.05	40.38 \pm 0.63	38.00 \pm 0.89	40.63 \pm 0.35
Recovery period (30 min)	33.90 \pm 0.67	35.23 \pm 1.28	34.56 \pm 1.51	35.72 \pm 1.03

Values are given as Mean \pm SD

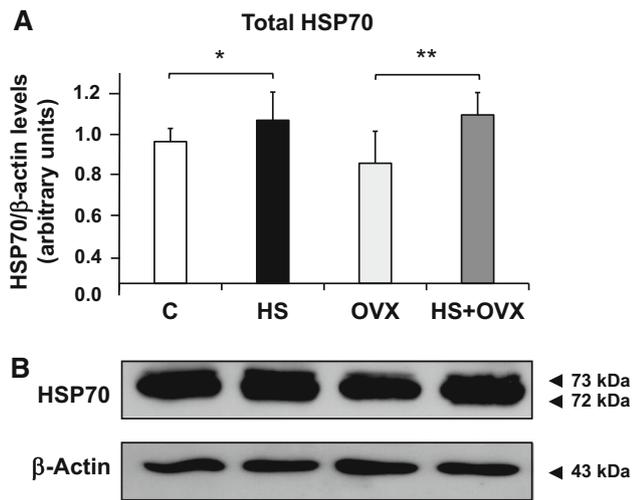


Fig. 2 HSP70 contents in aortic arches of control (C) and ovariectomized (OVX) rats subjected or not to heat shock session (HS and OVX + HS groups). The procedures were as described in Methods section. Data, expressed in terms of total HSP70 expressions (the constitutive HSP73 + the heat-inducible HSP72) relative to β -actin expression in the same gels, are the Mean \pm SEM. of 4 different preparations performed using 5–7 animals each. A gel representative of the observed means is given for each case. * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$. Statistics is described in Methods section

As stated above, glucose metabolism is closely related to HSP70 metabolism, particularly concerning plasma eHSP70. Decreasing glycemia in rats has been shown to conspicuously enhance eHSP70 plasma levels [9]. Conversely, exercise-induced rise in eHSP70 in humans may be completely abolished by glucose administration [27]. Then, we checked whether OVX, alone or combined with HS treatment, could modify glycemic response to glucose overload ipGTT. As depicted in Fig. 3, neither OVX was able to modify glycemic curves up to 120 min after glucose injection nor OVX + HS treatment. Also, there was no significant difference between IAUC obtained from the animals of these test groups. Therefore, short-term estrogen deprivation seems not to interfere in another important HSP70-related metabolic point: glycemic responses to glucose overloads.

All the above results were so far unexpected because one should suppose that estrogen reduction could interfere in tissue responses to HS treatment, since estrogens are involved in physiological expression of HSP70 under both normal and stressful situations [3–5]. Therefore, we further examined the possibility that either OVX or OVX + HS could change hematological profiles of the animals, especially because there is strong evidence in support of a role for HSP70 in regulating immune cell function [8]. As shown in Table 3, none of the maneuvers were capable of modifying WBC count or the remaining variables investigated, except plasma CRP values that were found to be

significantly ($p < 0.001$) reduced in OVX animals submitted to HS treatment.

Discussion

As stated in Methods section, we conceived the present experimental design (a short 7-day period of estrogen paucity) exactly to allow for the discrimination between direct E2 effects from those which could be a simple consequence of long-term absence of estrogens, such as oxidative-stress dependent endothelial dysfunctions and vascular senescence [37]. Hence, the apparently “negative” results are, instead, sounding. This is because the lack of OVX effects over physiological parameters, that could indicate oxidative stress and cellular dysfunctions, suggests that estrogen deprivation per se is not the unique triggering factor for the detrimental outcomes observed in post-menopausal individuals. Supporting the present observations is the pattern of transcriptome of early menopausal rodent ovaries, which has been found not only to still (despite the lack of E2) possess HSP70 expressions but also to have considerable upregulation of stress response factors, such as HSP70 and heme-oxygenase-1 [38]. In fact, HSP70 is able to halt ovarian follicular apoptosis by blocking the activity of caspase proteases or inhibiting chaperone-mediated protein import to the mitochondria [39], while in human ovarian granulosa cells, HS treatment induces a robust HSP70 response [40]. The novelty presented herein, however, is the fact that this also occurs at the level of blood vessels.

Physiologically healthy tissues are supposed to always respond to HS treatment by presenting a strong and convincing HS response which involves the expression of cytoprotective HSP70 [10]. Contrarily, a defective HS response, as observed in chronic inflammation-related metabolic diseases, is at the center of many age-associated illnesses, such as insulin resistance, type 2 diabetes mellitus (T2DM), and non-alcoholic fat liver disease (NAFLD) [14]. Therefore, the persistence of a good HS response, as inferred from HSP70 immunocontents in OVX group (Fig. 2), is an indicative that, in spite of the reduction in E2 faced by the animals, their aorta are still responsive to HS treatment. In other words, after this short-period estrogen deprivation, the HS response seems to be preserved, which suggests that the vessels are able to arm an efficient HSP70-based anti-inflammatory response, thus avoiding oxidative stress and tissue damage. In support to this statement is the [eHSP70]/[iHSP70] ratio, an indicative of the immunoinflammatory status [35], which was found to be unaltered (Table 2). Moreover, CRP values, whose plasma concentrations are associated with global risk of cardiovascular disease [41] and have been shown to

Table 2 Intracellular HSP70 content in the aortas and plasma biochemical parameters of control (C) and ovariectomized (OVX) rats subjected or not to heat shock session (HS and OVX + HS groups)

Variable	ANOVA P values and comparisons								
	C	HS	OVX	OVX + HS	C × HS	C × OVX	C × OVX + HS	HS × OVX + HS	OVX × OVX + HS
iHSP70 (arbitrary units) ^a	1.00 ± 0.04	1.15 ± 0.09	0.85 ± 0.09	1.19 ± 0.08	0.0097	0.0097	0.0097	ns	0.0097
eHSP70 (ng/mL)	1.83 ± 0.38	1.98 ± 0.54	1.27 ± 0.12	1.53 ± 0.24	ns	ns	ns	ns	ns
eHSP70/iHSP70 ratio	1.00 ± 0.21	0.94 ± 0.27	0.82 ± 0.12	0.70 ± 0.12	ns	ns	ns	ns	ns
SOD (U/mg protein)	0.020 ± 0.001	0.020 ± 0.002	0.022 ± 0.002	0.020 ± 0.002	ns	ns	ns	ns	ns
CAT (nmol/mg protein)	3.50 ± 0.72	2.03 ± 0.36	3.55 ± 0.72	1.96 ± 0.31	ns	ns	ns	ns	ns
TBARS (µM)	37.99 ± 4.77	53.52 ± 8.07	40.15 ± 4.29	33.30 ± 3.93	ns	ns	ns	ns	ns

^a iHSP70 was assessed in the aortic arches by immunoblot, eHSP70 was measured by ELISA and iHSP70 to eHSP70 ratio was calculated as described in Krause, Heck et al. [35]. SOD, CAT and TBARS were assessed in the plasma

Values are given as Mean ± SEM
ANOVA results less than 0.05 are in bold

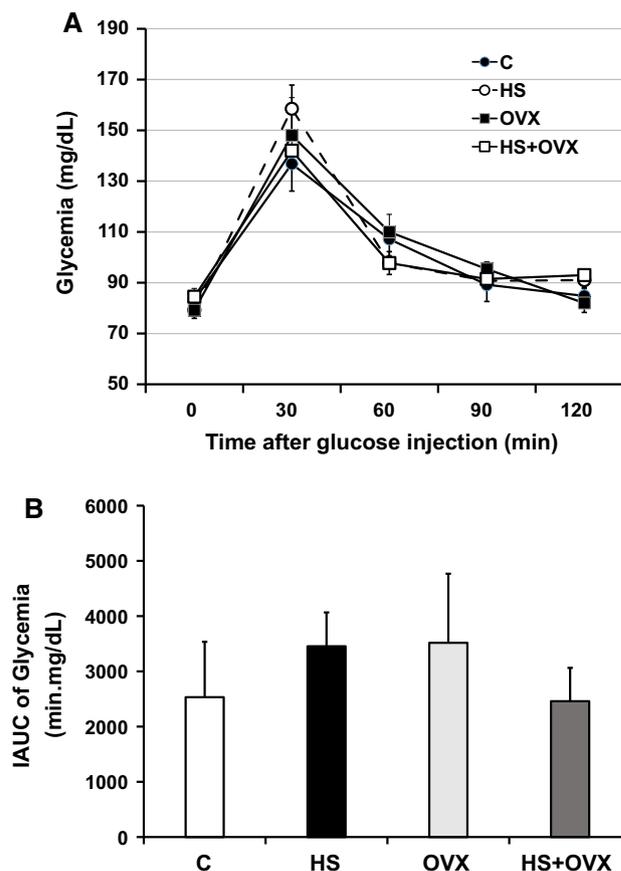


Fig. 3 Intraperitoneal glucose tolerance tests in control (C) and ovariectomized (OVX) rats subjected or not to heat shock session (HS and OVX + HS groups). Twelve h after hot tub sessions, the animals were probed with a glucose overload of 1 g/kg (i.p.). Blood was collected at the indicated time intervals for glycemic determinations. (a) Glycemic curves over 120 min period after glucose injection. (b) Incremental area under the curve (IAUC) as the means of each animal in the test group. Data are the Mean ± SEM

depress nitric oxide production by the endothelium [42], accelerating the progress of atherosclerosis [43] in both humans and laboratory animals, were found to be reduced in ovariectomized rats submitted to HS session (Table 3). This suggests that the expected anti-inflammatory effect of HS biochemical pathways is, in fact, still active.

The fact that oxidative stress markers in the plasma (superoxide dismutase, catalase, and lipoperoxidation) continued to be unaltered in OVX rats in respect to controls may explain at least partially why HS response, which is dependent on the integrity of redox intracellular status [21], was maintained after estrogen ablation. Therefore, although long-term estrogen deficiency is associated with oxidative stress and endothelial dysfunction [37], this seems not to be the case in a short-term observational period (7 days).

Recent studies from our laboratories have indicated that HSP70 status is intimately correlated with glycemic control

Table 3 Hematological parameters of control (C) and ovariectomized (OVX) rats subjected or not to heat shock session (HS and OVX + HS groups)

Variable	Groups				ANOVA
	C	HS	OVX	OVX + HS	
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	8.00 ± 2.49	11.53 ± 3.19	8.58 ± 1.79	12.35 ± 4.17	0.1391
%LYM	45.23 ± 15.03	32.75 ± 9.44	42.98 ± 3.67	44.65 ± 5.44	0.2279
%MON	20.38 ± 2.69	15.98 ± 5.60	17.42 ± 4.90	19.73 ± 4.61	0.5158
%GRA	34.40 ± 13.66	51.28 ± 11.89	39.84 ± 7.09	35.63 ± 6.87	0.1233
#LYM ($10^3/\text{mm}^3$)	3.45 ± 1.01	3.88 ± 2.00	3.62 ± 0.87	5.38 ± 1.33	0.2048
#MON ($10^3/\text{mm}^3$)	1.58 ± 0.43	1.83 ± 0.95	1.48 ± 0.58	2.30 ± 0.50	0.2943
#GRA ($10^3/\text{mm}^3$)	2.98 ± 1.81	5.83 ± 1.05	3.48 ± 0.79	4.68 ± 2.59	0.1116
Cell types (units)					
<i>Basophils</i>	2.75 ± 2.06	4.00 ± 2.16	2.40 ± 1.14	2.75 ± 0.96	0.5262
<i>Neutrophils</i>	43.50 ± 16.34	56.50 ± 7.94	44.60 ± 4.67	45.50 ± 6.61	0.2377
<i>Eosinophils</i>	0.75 ± 0.96	0.25 ± 0.50	0.80 ± 0.84	0.75 ± 0.50	0.6813
<i>Monocytes</i>	4.25 ± 0.50	4.50 ± 1.29	4.20 ± 1.10	2.75 ± 2.06	0.2814
<i>Lymphocytes</i>	48.75 ± 17.56	34.75 ± 10.50	48.00 ± 5.57	48.25 ± 6.70	0.2345
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	7.56 ± 0.44	8.19 ± 0.79	7.57 ± 0.45	7.15 ± 0.56	0.1276
HGB (g/dL)	14.00 ± 0.57	14.98 ± 1.81	14.18 ± 0.36	13.25 ± 0.82	0.1696
HCT (%)	42.03 ± 1.51	45.70 ± 5.51	42.62 ± 1.76	39.70 ± 2.72	0.1150
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	460.00 ± 218.90	436.75 ± 240.16	516.80 ± 115.05	691.50 ± 101.65	0.2116
PCT (%)	0.32 ± 0.14	0.31 ± 0.13	0.38 ± 0.09	0.45 ± 0.05	0.2887
MCV (fm^3)	55.50 ± 1.73	55.50 ± 1.73	56.20 ± 2.39	55.25 ± 0.96	0.8724
MCH (pg)	18.55 ± 0.87	18.30 ± 0.57	18.80 ± 1.10	18.58 ± 0.54	0.8473
MCHC (g/dL)	33.33 ± 0.75	32.80 ± 0.67	33.28 ± 0.74	33.43 ± 0.50	0.5802
RDW (%)	13.18 ± 1.01	13.83 ± 1.45	13.84 ± 0.82	13.53 ± 0.39	0.7375
MPV (fm^3)	7.15 ± 0.60	8.30 ± 2.73	7.22 ± 0.52	6.53 ± 0.43	0.3733
PDW (%)	4.40 ± 3.32	3.75 ± 3.59	5.76 ± 2.58	8.60 ± 2.09	0.1422
ESR (mm/1 h)	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	2.20 ± 0.45	2.00 ± 0.00	0.5338
CRP (% of cases)					χ^2
<6 mg/L	67 %	67 %	57 %	83 %	
>6 mg/L	33 %	33 %	43 %	17 %	16.0816 ($p < 0.001$)

Values are given as Mean ± SD; $n = 4$ for C, HS and OVX + HS groups; $n = 5$ for OVX group

WBC White blood cell, %LYM Lymphocyte percentage, %MON Monocyte percentage, %GRA Granulocyte percentage #LYM Total Lymphocyte count #MON Total Monocyte count #GRA Total granulocyte, RBC Red blood cells, HGB Hemoglobin, HCT Hematocrit, PLT Platelet total count, MCV Mean corpuscular volume, MCH Mean corpuscular hemoglobin, MCHC Mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW Red blood cell distribution width, MPV Mean platelet volume, PDW Platelet distribution width, ESR Erythrocyte sedimentation rate, CRP plasma C-reactive protein concentrations. χ^2 Pearson's Chi squared test

and vice versa [9], i.e., alterations in blood glucose may also interfere in HSP70 expression and its export towards the extracellular space. Poor HS response is a hallmark of T2DM [44] and obesity-related diseases [45] and predicts insulin resistance in humans and animal models [35, 36, 46]. Hence, a defective HS response is translated into poor glycemic control. As a corollary, the present results suggest that short-term decline in E2 was not able to influence this aspect of glucose-related HSP70 metabolism as well because ipGTT and the corresponding IAUC values were found to be unchanged after HS treatment of OVX in comparison with controls (Fig. 3). Although estrogen has

been shown to regulate both basal and exercise-stimulated HSP70 expressions [18] and that long-term estrogen deprivation has been demonstrated to induce bone loss in rodents due to an exacerbated inflammatory response that rises T cell function and TNF- α production [47], the capacity of rat aorta to respond to heat treatment by expressing HSP70 was found to be intact despite the absence of ovarian estrogen (Fig. 2). Hence, the lack of estrogen per se could not be solely ascribed as the unique source of low HSP70 expression as observed in long-term post-menopausal individuals. Other metabolic dysfunctions associated to long-term estrogen deprivation (e.g.,

enhanced fat tissue utilization, aging) should be involved as well.

Altogether, the present results suggest that HS response is still preserved after the onset of estrogen deprivation and this is accompanied by no alterations in important physiological features of the animal that are related to HSP70 synthesis, such as redox status, glycemic control, and hematological parameters. This is of note because reduced HSP70 expression in chronic inflammatory diseases is correlated with worsening of diabetes in obese patients [44], with the severity of non-alcoholic fatty liver disease in humans [45] and the dissemination of inflammation throughout the body [14]. Therefore, it is plausible to suppose that, somewhere after the initial drop of plasma estrogen concentrations in climacteric women, there should be a time in which HS response becomes threatened leading to many physiological dysfunctions that accompany menopause. As a consequence, monitoring the patient's HSP70 status would be of clinical relevance to determine hormone supplementation and other pharmacological interventions. This could be easily attained by assessing basal HSP70 contents in mononuclear cells, which parallel what happens in the rest of the body [35] as compared to circulating HSP70 (which reflects a chronic pro-inflammatory state better than CRP levels). Heat-treating these cells *in vitro* to determine the exact time point in which HS fails to trigger HS response is another possibility.

Whether hot flashes constitute a physiological response of the hypothalamus to the absence of the HSP70—inducing factor, E2, remains elusive. However, E2 is well known to trigger a small but consistent rise in core temperature, which is the main physiological factor for the start of HSP70 expression. As estrogen levels decline, norepinephrine levels increase, which causes an increase in hypothalamic serotonin receptors and changes in the thermoneutral zone [1, 48]. In addition, α -adrenergic stimulation (both central and peripherally) was found to increase tissue iHSP70 expression [49] as well as eHSP70 export towards the circulation [50]. Therefore, the hot flash hypothesis to help HS response during climacteric is not illogical. As a consequence, periodic evaluation of HSP70 status (iHSP70 vs. eHSP70) may be of clinical relevance because decreased HS response capacity is at the center of the onset of menopause-related dysfunctions. In other words, we predict that the time of failure in HS response might be critical for the start of special care in menopausal therapy.

Acknowledgments This work was partially supported by grants received from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) #563870/2010-9, 402626/2012-5, and 402364/2012-0 to PIHBJ. TGH was supported by grants from CNPq (382692/2011-0) and the State of Rio Grande Foundation for Research Support (FAPERGS, 002106-2551/13-5). AAM, MSL,

TGH, and PIHBJ designed the study. AAM, MSL, and TGH completed all the experiments described in this manuscript. FGB performed HS treatments, glucose status monitoring experiments, and Western analyses. Oxidative stress studies were conducted by ABS. MNF was involved in hematology and ELISA analyses. All authors were involved in analyzing the results. PIHBJ provided experimental advice and wrote the paper. All the authors had final approval of the submitted and published versions.

Ethical approval The procedures described herein were approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA #19858), according to the guidelines of the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest and no competing interests such as consultancies, financial involvement, and patent ownership in relation to the work described.

References

1. Stearns V, Ullmer L, López JF, Smith Y, Isaacs C, Hayes D (2002) Hot flushes. *Lancet* 360:1851–1861
2. Dacks PA, Rance NE (2010) Effects of estradiol on the thermoneutral zone and core temperature in ovariectomized rats. *Endocrinology* 151:1187–1193. doi:10.1210/en.2009-1112
3. Hamilton KL, Gupta S, Knowlton AA (2004) Estrogen and regulation of heat shock protein expression in female cardiomyocytes: cross-talk with NF kappa B signaling. *J Mol Cell Cardiol* 36:577–584
4. Hamilton KL, Mbai FN, Gupta S, Knowlton AA (2004) Estrogen, heat shock proteins, and NF- κ B in human vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1628–1633
5. Stice JP, Knowlton AA (2008) Estrogen, NF- κ B, and the heat shock response. *Mol Med* 14:517–527. doi:10.2119/2008-00026
6. Stice JP, Chen L, Kim SC, Jung JS, Tran AL, Liu TT, Knowlton AA (2011) 17 β -Estradiol, aging, inflammation, and the stress response in the female heart. *Endocrinology* 152:1589–1598. doi:10.1210/en.2010-0627
7. Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571–573
8. Heck TG, Scholer CM, de Bittencourt PI (2011) HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochem Funct* 29:215–226. doi:10.1002/cbf.1739
9. Ludwig MS, Minguetti-Câmara VC, Heck TG, Scomazzon SP, Nunes PR, Bazotte RB, Homem de Bittencourt PI Jr (2014) Short-term but not long-term hypoglycaemia enhances plasma levels and hepatic expression of HSP72 in insulin-treated rats: an effect associated with increased IL-6 levels but not with IL-10 or TNF α . *Mol Cell Biochem* 397:97–107. doi:10.1007/s11010-014-2176-2
10. Singh IS, Hasday JD (2013) Fever, hyperthermia and the heat shock response. *Int J Hyperthermia* 29:423–435. doi:10.3109/02656736.2013.808766
11. de Thonel A, Le Mouél A, Mezger V (2012) Transcriptional regulation of small HSP-HSF1 and beyond. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1593–1612. doi:10.1016/j.biocel.2012.06.012
12. Tang S, Burirro R, Liu Z, Zhang M, Ali I, Adam A, Hartung J, Bao E (2013) Localization and expression of Hsp27 and α B-crystallin in rat primary myocardial cells during heat stress *in vitro*. *PLoS One* 8:e69066. doi:10.1371/journal.pone.0069066
13. Anckar J, Sistonen L (2011) Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu Rev*

- Biochem 80:1089–1115. doi:[10.1146/annurev-biochem-060809-095203](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060809-095203)
14. Newsholme P, Homem de Bittencourt PI Jr (2014) The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 17:295–305. doi:[10.1097/MCO.0000000000000077](https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000077)
 15. Voss MR, Stallone JN, Li M, Cornelussen RN, Kneuferrmann P, Knowlton AA (2003) Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H687–H692
 16. Milne KJ, Thorp DB, Melling CW, Noble EG (2006) Castration inhibits exercise-induced accumulation of Hsp70 in male rodent hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H1610–H1616
 17. Papaconstantinou AD, Fisher BR, Umbreit TH, Goering PL, Lappas NT, Brown KM (2001) Effects of beta-estradiol and bisphenol A on heat shock protein levels and localization in the mouse uterus are antagonized by the antiestrogen ICI 182,780. *Toxicol Sci* 63:173–180
 18. Bombardier E, Vigna C, Bloemberg D, Quadriatero J, Tiidus PM, Tupling AR (2013) The role of estrogen receptor- α in estrogen-mediated regulation of basal and exercise-induced Hsp70 and Hsp27 expression in rat soleus. *Can J Physiol Pharmacol* 91:823–829
 19. Goloubkova T, Ribeiro MF, Rodrigues LP, Ceconello AL, Spritzer PM (2000) Effects of xenoestrogen bisphenol A on uterine and pituitary weight, serum prolactin levels and immunoreactive prolactin cells in ovariectomized Wistar rats. *Arch Toxicol* 74:92–98
 20. Knapp RT, Wong MJ, Kollmannsberger LK, Gassen NC, Kretschmar A, Zschocke J, Hafner K, Young JC, Rein T (2014) Hsp70 cochaperones HspBP1 and BAG-1 M differentially regulate steroid hormone receptor function. *PLoS One* 9:e85415. doi:[10.1371/journal.pone.0085415](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085415)
 21. Ahn SG, Thiele DJ (2003) Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev* 17:516–528
 22. Zou W (2011) Ovariectomy (oophorectomy). *Protoc Exch*. doi:[10.1038/protex.2011.242](https://doi.org/10.1038/protex.2011.242)
 23. Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MH, Mesa JL, Lancaster GI, Southgate RJ, Bruce CR, Duffy SJ, Horvath I, Mestrlil R, Watt MJ, Hooper PL, Kingwell BA, Vigh L, Hevener A, Febbraio MA (2008) HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1739–1744. doi:[10.1073/pnas.0705799105](https://doi.org/10.1073/pnas.0705799105)
 24. Brown ET, Umino Y, Loi T, Solessio E, Barlow R (2005) Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6 J mice. *Vis Neurosci* 22:615–618. doi:[10.1017/S0952523805225105](https://doi.org/10.1017/S0952523805225105)
 25. Saha JK, Xia J, Grondin JM, Engle SK, Jakubowski JA (2005) Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:777–784
 26. Chang Y, Chen TL, Sheu JR, Chen RM (2005) Suppressive effects of ketamine on macrophage functions. *Toxicol Appl Pharmacol* 204:27–35. doi:[10.1016/j.taap.2004.08.011](https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.011)
 27. Febbraio MA, Mesa JL, Chung J, Steensberg A, Keller C, Nielsen HB, Krstrup P, Ott P, Secher NH, Pedersen BK (2004) Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans. *Cell Stress Chaperon* 9:390–396
 28. Bedell SE, Bush BT (1985) Erythrocyte sedimentation rate. From folklore to facts. *Am J Med* 78(6):1001–1009
 29. Homem de Bittencourt PI Jr, Lagranha DJ, Maslinkiewicz A, Senna SM, Tavares AMV, Baldissera P, Janner DR, Peralta JS, Bock PM, Gutierrez LLP, Scola G, Heck TG, Krause MS, Cruz LA, Abdalla DSP, Lima T, Curi R (2007) LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 193:245–258. doi:[10.16/j.atherosclerosis.2006.08.049](https://doi.org/10.16/j.atherosclerosis.2006.08.049)
 30. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
 31. Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302–309
 32. Marklund S, Marklung G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47:469–474
 33. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121
 34. Kolberg A, Rosa TG, Puhl MT, Scola G, da Rocha Janner D, Maslinkiewicz A, Lagranha DJ, Heck TG, Curi R, de Bittencourt PI Jr (2006) Low expression of MRP1/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumour-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. *Cell Biochem Funct* 24:23–39. doi:[10.1002/cbf.1290](https://doi.org/10.1002/cbf.1290)
 35. Krause MS, Heck TG, Bittencourt A, Scorzazon SP, Newsholme P, Curi R, Homem de Bittencourt PI Jr (2015) The chaperone balance hypothesis: the importance of the Extracellular to Intracellular HSP70 Ratio (eHSP70/iHSP70) to inflammation-driven type 2 Diabetes, the effect of exercise and the implications for clinical management. *Mediat Inflamm* 2015:249205. doi:[10.1155/2015/249205](https://doi.org/10.1155/2015/249205)
 36. Krause MS, Bock PM, Takahashi HK, Homem de Bittencourt PI Jr, Newsholme P (2015) The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes. *Clin Sci (London)* 128:789–803. doi:[10.1042/CS20140695](https://doi.org/10.1042/CS20140695)
 37. Wassmann S, Bäumer AT, Strehlow K, van Eickels M, Grohé C, Ahlbory K, Rösen R, Böhm M, Nickenig G (2001) Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 103:435–441
 38. Zimon A, Erat A, Von Wald T, Bissell B, Koulova A, Choi CH, Bachvarov D, Reindollar RH, Usheva A (2006) Genes invoked in the ovarian transition to menopause. *Nucleic Acids Res* 34:3279–3287
 39. Yoon SJ, Choi KH, Lee KA (2002) Nitric oxide-mediated inhibition of follicular apoptosis is associated with HSP70 induction and Bax suppression. *Mol Reprod Dev* 61:504–510
 40. Kim AH, Khanna A, Aten RF, Olive DL, Behrman HR (1996) Cytokine induction of heat shock protein in human granulosa-luteal cells. *Mol Hum Reprod* 2:549–554
 41. Ridker PM (2001) High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 103:1813–1818
 42. Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ (2002) A self-fulfilling prophecy C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 106:913–919
 43. Paul A, Ko KW, Li L, Yechoor V, McCrory MA, Szalai AJ, Chan L (2004) C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 109:647–655 (Erratum in: *Circulation*. 2004 May 11;109(18):2254)
 44. Rodrigues-Krause J, Krause M, O'Hagan C, De Vito G, Boreham C, Murphy C, Newsholme P, Collieran G (2012) Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? *Cell Stress Chaperon* 17:293–302. doi:[10.1007/s12192-011-0319-x](https://doi.org/10.1007/s12192-011-0319-x)
 45. Di Naso FC, Porto RR, Fillmann HS, Maggioni L, Padoin AV, Ramos RJ, Mottin CC, Bittencourt A, Marroni NA, Homem de Bittencourt PI Jr (2015) Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression. *Obesity* 23:120–129. doi:[10.1002/oby.20919](https://doi.org/10.1002/oby.20919)

46. Chichester L, Wylie AT, Craft S, Kavanagh K (2015) Muscle heat shock protein 70 predicts insulin resistance with aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 70:155–162. doi:[10.1093/gerona/глу015](https://doi.org/10.1093/gerona/глу015)
47. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R (2000) Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest* 106:1229–1237
48. Krause MS, Nakajima ST (2015) Hormonal and nonhormonal treatment of vasomotor symptoms. *Obstet Gynecol Clin North Am* 42:163–179. doi:[10.1016/j.ogc.2014.09.008](https://doi.org/10.1016/j.ogc.2014.09.008)
49. Rossato JS, Krause MS, Fernandes AJ, Fernandes JR, Seibt IL, Rech A, Homem de Bittencourt PI Jr (2014) Role of alpha- and beta-adrenoreceptors in rat monocyte/macrophage function at rest and acute exercise. *J Physiol Biochem* 70:363–374. doi:[10.1007/s13105-013-0310-3](https://doi.org/10.1007/s13105-013-0310-3)
50. Johnson JD, Campisi J, Sharkey CM, Kennedy SL, Nickerson M, Fleshner M (1985) Adrenergic receptors mediate stress-induced elevations in extracellular Hsp72. *J Appl Physiol* 99:1789–1795

- 1 **ANEXO II – ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA CLINICAL SCIENCE:**
- 2 *Are menopausal hot flushes a hypothalamic attempt to retrieve a normal*
- 3 *heat shock response in the absence of hsp70-inducing estrogens?*
- 4

5 *Are menopausal hot flushes a hypothalamic attempt to*
6 *retrieve a normal heat shock response in the absence of*
7 *HSP70-inducing estrogens?*

8
9

10 *Antônio Azambuja Miragem, M.Sc.^{1,2†}; Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr. Ph.D.^{1*}*

11

12 ¹ *Department of Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, Porto*
13 *Alegre, RS, 90050-170 Brazil*

14 ² *Federal Institute of Education, Science and Technology “Farroupilha”, Santa Rosa, RS, Brazil*

15
16

17

18 *Funding: The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the*
19 *State of Rio Grande do Sul Foundation for Research Support (FAPERGS)*

20

21

22

23

24

25

26

27

28 *Correspondence should be addressed to PIHBJ (phone: +55(51) 33083151; fax: +55(51)33084555; e-
29 mail: pauloivo@ufrgs.br)

30

31 Summary

32 *Hot flashes accompany decreasing estrogen levels of climacteric and postmenopausal women.*
33 *Although they are the most common complaint of this particular group of women, the pathophysiology of*
34 *this very unpleasant vasomotor symptom is greatly unknown. On the other hand, estradiol (E2) has been*
35 *found to induce the expression of HSP72, a member of the 70 kDa family of heat shock proteins (HSP70),*
36 *which are anti-inflammatory, cytoprotective and cardioprotective chaperones whose expression is*
37 *modulated by heat as well as other types of physiological stresses. Additionally, HSP70 expression is*
38 *compromised in age-related inflammatory diseases. In fact, reduced HSP70 expression in chronic*
39 *inflammatory diseases is correlated with worsening of diabetes in obese patients, with the severity of*
40 *nonalcoholic fatty liver disease in humans and the dissemination of inflammation throughout the body.*
41 *Therefore, it is plausible to suppose that, somewhen after the initial drop of estrogen concentrations, there*
42 *should be a time in which HSP70 expression becomes dampened leading to many physiological*
43 *dysfunctions that accompany menopause. Hence, we hypothesize that, in the absence of estrogen-induced*
44 *HSP70 expression, the anterior hypothalamus could trigger, in most menopausal women, the start of rapid*
45 *episodes of temperature rise in order to overcome the absence of HSP70 throughout the body thus re-*
46 *establishing HSP70-mediated cytoprotection and anti-inflammatory status. If this is so, close follow-up of*
47 *patient HSP70 levels as well as HSP70-inducing maneuvers (physical exercise, hot tub) could be of value*
48 *in preventing menopause-related dysfunctions.*

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58 **INTRODUÇÃO/BACKGROUND**

59 *O aumento contundente da expectativa de vida da população mundial de ambos*
60 *os sexos permite prever que a população feminina possa viver cerca de, no mínimo, um*
61 *terço de suas vidas no período pós-menopausa (1). Na última década do século XX havia*
62 *mais de 450 milhões de mulheres com idade igual ou superior a 50 anos. Para o ano de*
63 *2030, a estimativa é que este grupo ultrapasse 1.2 bilhão de mulheres (2). Menopausa*
64 *[do grego: men- (mês), -pausis (parada/interrupção)] apresenta quadro clínico definido*
65 *pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a ausência permanente da*
66 *menstruação, dentro de um intervalo não inferior a 12 meses de amenorreia,*
67 *consequência da perda da função folicular ovariana não patológica ou da retirada*
68 *cirúrgica dos ovários (3), associada a níveis plasmáticos de FSH superiores à 40 IU/L*
69 *(4). Considerada como o final da vida fértil da mulher, a menopausa natural ocorre em*
70 *média aos 50 anos de idade (3). É um processo transitório lento, raramente ocorre de*
71 *forma súbita, compreende um intervalo médio de 2 à 8 anos, denominado climatério ou*
72 *transição menopáusica (5). Este período pode apresentar sinais e sintomas, isolados ou*
73 *concomitantes, capazes de interferir diretamente no estilo e qualidade de vida das*
74 *mulheres, além de aumentar o risco de desenvolvimento de doenças crônicas*
75 *degenerativas, como Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares (DCV),*
76 *osteoporose e câncer (6 – 10). Na lista fatores relacionados ao status metabólico*
77 *menopáusico encontram-se sintomas vasomotores: fogachos, suores noturnos e*
78 *palpitações; sintomas urogenitais: incontinência e infecção do trato urinário, atrofia e*
79 *ressecamento vaginal; e sintomas psicocognitivo: perda da memória, dificuldade de*
80 *concentração, transtorno de humor, distúrbio do sono, depressão e ansiedade.*
81 *Susceptível ao surgimento destes eventos fisiológicos e fisiopatológicos, o corpo humano*
82 *feminino produz um novo cenário orgânico complexo, em desequilíbrio. Resta ainda a*

83 possibilidade do ressecamento capilar, perda da flexibilidade da pele, diminuição da
84 libido, dores musculó-articulares e fadiga (11 – 13). Embora esta transição pertença ao
85 conjunto de processos naturais do envelhecimento do organismo feminino, tais
86 alterações resultam em um grande número de disfunções celulares, a priori, lideradas
87 pela diminuição nos níveis de estrogênio, acompanhadas de reduções consideráveis em
88 mecanismos de defesa celulares como a Heat Shock Response (HSR).

89

90 **Hipertermia e a resposta ao choque térmico**

91 *Para a evolução das espécies, as adaptações térmicas desempenharam função*
92 *primordial para a seleção e manutenção da vida. A capacidade de responder as*
93 *variações de temperatura, desenvolveram um complexo e eficiente conjunto de*
94 *mecanismos celulares capazes de, a curto prazo (aclimatação) e longo prazo*
95 *(adaptação), modular a temperatura do organismo – sistema de termorregulação (14).*
96 *A partir de núcleos hipotalâmicos (e.g. área pré-óptica), de forma coordenada, neurônios*
97 *termossensíveis (frio e calor) controlam as respostas fisiológicas da sensação de calor,*
98 *sudorese e vasodilatação, a fim de ajustar a homeostase térmica do milieu intérieur.*
99 *Portanto, tanto na hipertermia, quanto na resposta febril, ocorre o aumento da*
100 *temperatura corporal, sem ou com alterações do limiar térmico regulatório no sistema*
101 *nervoso central (15). Assim, respostas do organismo a diferentes ameaças,*
102 *potencialmente danosas ao mesmo, como em situações inflamatórias, durante a resposta*
103 *pró-inflamatória (na presença de febre ou desafios metabólicos), é fundamental para a*
104 *sobrevivência.*

105 *Durante o processo de resposta inflamatória (incluindo a fase de resolução da*
106 *inflamação), ocorre no ambiente celular um conjunto coordenado de eventos*
107 *transcricionais, centrados em fatores de transcrição da família κB (por exemplo, NF- κB)*

108 (16), responsáveis pela condução da inflamação durante a fase inicial, mas ao mesmo
109 tempo direcionando a sua resolução. No início da resposta inflamatória e sob o controle
110 de NF κ B, enzimas induzíveis (incluindo a ciclo-oxigenase 2; COX 2), modula a síntese
111 de PGE₂, a qual é capaz de induzir uma hipertermia a partir de alterações nos limiares
112 de temperatura corporal, dentro do SNC, levando à febre. Esta elevação de temperatura
113 corporal desencadeia um processo, altamente conservado filogeneticamente, chamado
114 resposta ao choque térmico (Heat Shock Response). A resposta ao choque térmico é
115 regulada por regiões altamente conservadas do DNA chamadas elementos de choque
116 térmico (HSE) e também por proteínas associadas ao DNA igualmente conservadas,
117 denominadas fator de transcrição de choque térmico (HSF) (17). Este mecanismo ativa
118 um programa de transcrição gênica a partir do Fator de Transcrição de Choque Térmico
119 – 1 (HSF-1; Heat Shock Factor – 1) (18). Como resultado da ativação de HSF-1, a célula
120 aumenta de forma significativa a expressão de proteínas de choque térmico (HSP – Heat
121 Shock Protein), cuja maior representante é a família de HSP de 70 kDa (HSP70). Em
122 foco, a família de HSPs de 70 kDa (HSP70), corresponde ao conjunto de proteínas com
123 pesos moleculares entre 66 a 78 kDa. O destaque ao papel das HSPs70 se dá devido a
124 sua alta expressão induzida, em células de mamíferos, sob diversas condições de estresse
125 e por ser uma proteína altamente conservada filogeneticamente, encontrada desde
126 organismos menos complexos como leveduras e vermes à mamíferos, inclusive humanos,
127 o que destaca sua importância evolutiva (17, 19). Assim, HSP72 pode ser prontamente
128 sintetizada sob uma condição de desequilíbrio homeostático, como estresse oxidativo e
129 exercício (20), hipóxia (21), infecção viral (22), contaminação por metais pesados (23),
130 isquemia (24), estresse metabólico (25), fatores ambientais - poluição/agrotóxicos (26,
131 27), dentre outros.

132 *Este aumento na expressão HSP72 induzida por HSF1 será responsável pela*
133 *defesa da célula contra um estresse proteotóxico, buscando reestabelecer a proteostase*
134 *(homeostase proteica), conferindo, então citoproteção (28). Ainda neste contexto, as*
135 *pequenas proteínas de choque térmico induzidas por febre, tal como HSP27, também*
136 *contribuem para a citoproteção (29, 30).*

137

138 ***Resposta ao choque térmico e inflamação***

139 *A Heat Shock Response (HSR) desempenha um papel crucial para promover a*
140 *resolução da inflamação. Além do seu papel na manutenção da proteostase celular, a*
141 *HSP70 atua como uma chaperona molecular, para regular a formação de agregados*
142 *proteicos e reverter a desnaturação de proteínas. É capaz de associar-se com o complexo*
143 *formado por NF- κ B com o seu inibidor (I κ B) impedindo assim a translocação para o*
144 *núcleo do fator de transcrição inflamatório (31). Portanto, a HSR é de fato uma resposta*
145 *anti-inflamatória, uma vez que as proteínas NF- κ B-dependentes estão no centro de*
146 *praticamente todas as respostas inflamatórias (32). Além disso, a prostaglandina E2*
147 *(PGE₂) e outras PGs produzidas durante o início da inflamação podem ser convertidas*
148 *nos seus respectivos produtos de desidratação, tais como PGA₂ e PGs da família J, as*
149 *quais são, prostaglandinas ciclopentenônicas (cyPGs), $\alpha\beta$ -insaturadas, que possuem um*
150 *alto poder anti-inflamatório, demonstrados tanto em ensaios in vitro, quanto in vivo (33)*
151 *Conforme demonstrado em estudos clássicos pelo grupo da Professora Maria Gabriella*
152 *Santoro na Itália, a inibição da ativação de NF- κ B é parcialmente dependente cyPGs,*
153 *pois as cyPGs são fortes indutores fisiológicos de HSP70, tanto quanto a resposta ao*
154 *choque térmico. Em outras palavras, a ação anti-inflamatória das cyPGs será máxima*
155 *somente quando a expressão de HSP70 for elevada (34). Além disso, cyPGs são*
156 *compostos anti-inflamatórios derivados da inflamação em virtude da inibição direta da*

157 *quinase I κ B- β (IKK β), que fosforila I κ B levando à ativação de NF κ B durante a*
158 *inflamação (35). Além disso, estudos recentes mostram que HSF-1 ativado a partir de*
159 *choque térmico, controla diretamente a transcrição de COX 2, permitindo, assim, um*
160 *alto rendimento na produção de PGE₂ durante a inflamação (36).*

161 *Numerosos estudos, no entanto, indicam que a HSR está gravemente prejudicada*
162 *em tecidos metabólicos durante inflamação crônica. No que diz respeito à resistência à*
163 *insulina e diabetes tipo 2, verificou-se que a expressão de mRNA que codifica para a*
164 *forma induzível de HSP70 (gene HSPA1A) foi dramaticamente reduzida (90% de*
165 *decréscimo) em biópsias musculares esqueléticas dos pacientes com diabetes tipo 2, em*
166 *comparação com voluntários saudáveis (37). Observações semelhantes foram relatadas*
167 *em pacientes diabéticos (DM2) obesos e não-obesos, em que uma acentuada redução na*
168 *expressão de HSP70 foi detectada em comparação com os indivíduos controles obesos*
169 *(38). Além disso, os pacientes com diabetes tipo 2 apresentam diminuição na expressão*
170 *intramuscular de ambas moléculas, HSP70 e hemeoxigenase (39), de modo que as*
171 *defesas anti-inflamatórias e antioxidantes associadas à HSR estão seriamente*
172 *comprometidas, possível reflexo do [des]balanço do estado redox.*

173 *Estudos em nosso laboratório (40) observaram que o eixo HSF1-HSP70 é*
174 *progressivamente suprimido no tecido adiposo e fígado de pacientes obesos resistentes à*
175 *insulina, como o que ocorre na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), a*
176 *qual evolui de esteatose para formas mais inflamatórias da doença (e.g. esteato-hepatite*
177 *acompanhada por fibrose). A supressão do eixo HSF1-HSP70 está fortemente*
178 *correlacionada com o grau de aumento da expressão de ambas, JNK1 e JNK2 no tecido*
179 *adiposo, o que foi seguido por aumentos semelhantes nos valores JNK1 e JNK2*
180 *difosforilados (Thr183 / Tyr185). Assim, o tecido adiposo de pacientes resistentes à*

181 *insulina está associada com uma HSR suprimida. Esta é uma situação complexa porque*
182 *HSP70 induzida pelo estresse inibe a transdução de sinal da JNK (41).*

183 *Neste sentido, diferentes intervenções estão sendo propostas para reestabelecer as*
184 *defesas celulares via HSR. Tratamentos farmacológica (e.g., o BGP-15 derivado de*
185 *hidroxilamina, um coindutor de HSP, agora sob ensaio clínico), bem como fisiológicos*
186 *(e.g. hipertermia via imersão corporal) começam a ser considerados como métodos*
187 *terapêuticos promissores para DM2 (42). Recentemente, Krause e cols. indicaram*
188 *abordagens experimentais para o tratamento à base de hipertermia de doenças*
189 *inflamatórias (43). Além disso, estudos de nosso laboratório, utilizando um modelo*
190 *animal para aterosclerose (camundongo KO para receptor de LDL), submetidos a*
191 *choque térmico (41,5 ° C durante 15 min) uma vez por semana, ao longo de 8 semanas,*
192 *demonstrou uma redução significativa da doença vascular, um aumento no fluxo*
193 *sanguíneo e uma redução de proteínas inflamatórias associadas a HSR no arco aórtico*
194 *(Bruxel et al., manuscrito em preparação)*

195 *A interação entre obesidade, diabetes, doença cardiovascular, inflamação crônica*
196 *e as vias de HSP70 compreende uma complexa operação em nível de regulação gênica.*
197 *A região promotora de TNF α contém um sítio de ligação para HSF1, o qual é capaz de*
198 *reprimir a transcrição do TNF α . Desta forma, com a reduzida atividade de HSF1 devido*
199 *a disfunção da HSR, conforme anteriormente descrito, ocorre uma continua transcrição*
200 *de TNF α (44), na ausência do elemento repressor (HSF1). Isto possivelmente explica por*
201 *que animais knockout (KO) para HSF1 estão associados com o aumento crônico nos*
202 *níveis TNF α e aumento da susceptibilidade à desafios endotóxicos (41, 45). A regulação*
203 *desta modulação gênica no sentido oposto também é possível. TNF α pode*
204 *transitoriamente reprimir a ativação de HSF1 (46). Além disso, estudos demonstraram*
205 *que JNK1 fosforila HSF1 em seu domínio regulatório causando a supressão da atividade*

206 *transcricional de HSF1, enquanto que HSP70 previne a ativação de Bax por inibir a via*
207 *JNK/Bim (45, 47).*

208

209 ***Resposta ao choque térmico e estrogênio***

210 *Os estrogênios, hormônios esteroides, inicialmente descritos por suas ações*
211 *exclusivamente genômicas, através do acoplamento e translocação nuclear de seus*
212 *receptores, exercem diversas funções em todo o organismo (48, 49). Além dos seus efeitos*
213 *nucleares, existem ações deslocadas do núcleo (citoplasmáticas e na membrana celular),*
214 *bem como ações diretas e indiretas independente de receptor, ou do próprio receptor não*
215 *ligado ao hormônio. Os benefícios fisiológicos atribuídos aos estrogênios,*
216 *principalmente no sistema nervoso central (SNC) e sistema cardiovascular são*
217 *provenientes do 17 β -estradiol (E2). Principal estrogênio biologicamente ativo, E2 elenca*
218 *entre suas características as propriedades antioxidantes e vasodilatadoras. Com efeito,*
219 *no sistema cardiovascular, E2 exerce ações antioxidantes por induzir alterações no perfil*
220 *lipídico, através da elevação do HDL, diminuição do LDL e ativação da eNOS e*
221 *produção de NO (50 – 53).*

222 *Embora, alguns efeitos dos estrogênios sejam amplamente conhecidos, a relação*
223 *entre o hormônio, outras biomoléculas (possíveis biomarcadores) e diferentes vias de*
224 *sinalização celulares (e possíveis interações) seguem desconhecidas. Considerado um*
225 *hormônio pleiotrópico, desempenha papel metabólico fundamental em todos os sistemas*
226 *do organismo, incluindo o tecido adiposo, muscular, esquelético, nervoso e*
227 *cardiovascular (54 – 58).*

228 *Além disso, E2 regula a produção de outras biomoléculas vaso ativas como as*
229 *prostaglandinas (59, 60) e proteínas de estresse (HSPs) (61 – 64), as quais tem relação*

230 *direta com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Estrogênio também*
231 *é capaz de inibir os efeitos de fatores de transcrição inflamatórios, como o NF- κ B e TNF-*
232 *α , que quando ativados, induzem a expressão de citocinas, enzimas inflamatórias,*
233 *moléculas de adesão e receptores inflamatórios (44, 65). Estudos demonstram que o*
234 *estrogênio confere citoproteção cardiovascular através de regulação positiva de*
235 *diferentes proteínas de choque térmico (HSPs), como HSP27, HSP60, HSP90, e em*
236 *especial a HSP70 (66, 67). Reforçando a forte relação entre o estrogênio e a resposta ao*
237 *estresse.*

238 *Uma vez estimuladas, as células são capazes de promover rápidas adaptações*
239 *(e.g. síntese proteica) para a manutenção da homeostase e sobrevivência celular. A*
240 *exposição a estas situações de estresse (em nível sub letal) desencadeia uma cascata de*
241 *sinalização, por vezes reparadora, através da indução da transcrição de genes*
242 *específicos (68). Os produtos destes genes levarão à sobrevida ou morte celular, de*
243 *acordo com a capacidade adaptativa a tais condições de estresse.*

244 *HSPs e estrogênio apresentam inter-relação citoprotetora conhecida no sistema*
245 *cardiovascular. Voss e colaboradores demonstraram que ratas fêmeas possuem mais*
246 *HSP72 do que machos no tecido cardíaco (69). Apesar da diferença endócrina de gêneros*
247 *já conhecida, devido a presença do hormônio ovariano, quando células cardíacas de*
248 *ratos foram tratados com estrogênio ocorreu uma super expressão HSP72, acompanhada*
249 *de HSP90 (61). Comparativamente, a relação entre estrogênio e HSP70 parece estar*
250 *acontecendo de forma inversa no músculo esquelético, uma vez que ratos machos*
251 *responderam com uma maior indução de HSP70 no músculo esquelético do que as*
252 *fêmeas, após exercício. Além disso, esta variação no padrão de resposta ao exercício*
253 *parece ser modulada negativamente na presença do estrogênio. Quando animais*

254 *ovariectomizadas (OVX) foram submetidas à exercício, apresentaram maiores níveis de*
255 *HSP70 muscular do que os indivíduos tratados com o esteroide (70 – 72).*

256 *Durante o envelhecimento do organismo feminino, ocorre a continua redução na*
257 *produção hormonal resultante do processo de falência ovariana. A citoproteção exercida*
258 *pelo estrogênio, como regente de uma possível resposta anti-inflamatória do sistema*
259 *cardiocirculatório, passa a ser ameaçada com a menopausa. O susceptibilidade*
260 *cardiovascular das mulheres aumenta ao passo que, o risco de desenvolvimento de*
261 *doenças cardiovasculares (DCV) iguala-se à dos homens na mesma idade, o que sugere*
262 *um efeito de cardioprotetor do estrogênio durante a pré-menopausa. Porém, não existem*
263 *evidências de que a terapia de reposição hormonal (TRH), seja capaz de reestabelecer a*
264 *vasoproteção contra as DCV (6, 7).*

265 *Torna-se razoável pensarmos que a capacidade de adaptação do organismo, a*
266 *nível metabólico, não se esgota in loco. Diante da ausência hormonal de estrogênio,*
267 *decorrente da menopausa, o que objetivamente, fragiliza completamente o arranjo anti-*
268 *inflamatório vascular, pensemos: Qual solução seria possível para a célula endotelial,*
269 *no mínimo, manter uma Heat Shock Response adequada? Seria a expressão de HSP70*
270 *no endotélio vascular e/ou no SNC o marcador metabólico para desencadear um episódio*
271 *de fogacho?*

272

273 ***A tentativa do hipotálamo de restabelecer a heat shock response: a hipótese***

274 *Considerado um evento fisiopatológico, ainda com gênese desconhecida, o*
275 *fogacho é o sintoma mais comum presente em mulheres ocidentais na transição*
276 *menopáusia. Em países desenvolvidos, a taxa de experiência diária de fogachos em*
277 *mulheres em idade climatérica se aproxima de 90%, e um terço destas de 10 episódios*
278 *por dia (73). Nos relatos clínicos, são descritos como sensações térmicas extremas de*

279 calor, sudorese e calafrios. Em relação a localização corporal, são referidas as partes
280 superiores do corpo, como tórax, pescoço e cabeça (74). Coincidentemente, nestas
281 regiões corporais estão localizados os leitos vasculares centrais, como a raiz da aorta,
282 carótidas e toda a irrigação cerebral.

283 Da forma como se apresenta, esse conjunto de efeitos associadas a
284 presença/ausência de estrogênios, nos leva a acreditar que o organismo de mulheres na
285 pós-menopausa esteja respondendo, a partir destes sintomas, a fim de prevenir
286 patologias ósseas e vasculares associadas com o envelhecimento. De fato, os fogachos
287 estão presentes na maioria das mulheres pós-menopausa, e a reposição de estrogênio,
288 praticamente, elimina os sintomas vasomotores. Porém a redução dos estrogênios
289 (falência ovariana), de forma isolada, não explica os surgimentos dos fogachos (75).
290 Sabe-se que não existe diferença significativa nos níveis plasmáticos de estradiol em
291 mulheres com experiência de fogachos e as assintomática. Porém, um estudo mostrou
292 que mulheres sintomáticas para fogacho apresentam menores valores do hormônio e
293 conseqüentemente respondem com um maior número de eventos (76).

294 As conseqüências deste aumento do número de fogachos, hormônio dependente,
295 segue desconhecida. Acreditamos que outras modificações hormonais, com reflexo no
296 endotélio, possam influenciar de forma sinérgica, porém de maneira secundária o
297 metabolismo vascular. Existe, por exemplo, uma relação entre episódios de fogacho e
298 pulsos de hormônio luteinizante (LH) (77, 78). Porém em diferentes situações esta
299 relação desaparece. Mulheres com deficiência de gonadotrofinas apresentam fogacho,
300 mas não demonstram pulsos de LH e mulheres com quadro de amenorreia hipotalâmica
301 produzem pulsos de LH, mas não tem episódios de fogacho (79).

302 A relação fogacho/estrogênio parece ter conseqüências específicas na resposta
303 inflamatória do sistema cardiovascular. O endotélio vascular apresenta características

304 multifuncionais a partir de um complexo sistema produtor/modulador de substâncias
305 vasoativas. É um órgão simultaneamente ativo, de forma autócrina e parácrina, com a
306 capacidade para autorregular sua contratilidade e fluidez sanguínea para a manutenção
307 da homeostase circulatória (80). O tecido endotelial atua na regulação da atividade
308 plaquetária, com consequentes efeitos na resposta inflamatória. Com papel central na
309 manutenção do equilíbrio celular, a produção de óxido nítrico (NO) e suas biointerações
310 tem implicações diretas na suscetibilidade à DCV (81).

311 O óxido nítrico (NO) participa de vários eventos de sinalização e comunicação
312 celular no endotélio saudável. É capaz de inibir o processo de agregação plaquetária,
313 adesão de monócitos, expressão de moléculas de adesão, além de impedir a proliferação
314 de células musculares lisas para o consequente espessamento da parede vascular.
315 Coincidentemente, este conjunto de respostas desencadeadas por esta espécie nitrosativa
316 determina o desenvolvimento e a progressão da lesão aterosclerótica (82). Neste mesmo
317 endotélio, E2 é capaz de induzir vaso dilatação, via produção local de NO. Esta secreção
318 de NO, a qual leva a inibição da ativação plaquetária, ocorre em um mecanismo
319 dependente de guanosina 3', 5'-monofosfato cíclica (cGMP) (83). Em cultura de células
320 endoteliais, E2 potencializa a liberação de NO em poucos minutos sem alterar a
321 expressão de eNOS, através da ativação da eNOS, por duas vias concomitantes: MAPK
322 e PI3K/Akt. Em ambos os casos, o receptor de estrogênios tipo α ($ER\alpha$) e receptores de
323 glicocorticoides ativam PI3K pela associação com sua subunidade reguladora p85 α na
324 condição de ligante dependente. Posteriormente, HSP90 interage com ambos, eNOS e
325 Akt e modula a atividade da eNOS por atuar como um apoiador na fosforilação
326 dependente de Akt da própria eNOS (84 – 86).

327 Está bem estabelecido que agentes estressores causam a regulação positiva de
328 proteínas de choque térmico (HSP) (87). Para que isso aconteça, existe a necessidade da

329 presença de diferentes substratos no ambiente celular, como outras chaperonas que
330 atuem de modo a impedir a agregação proteica e ajudar a garantir a correta
331 conformação da estrutura da proteína, bem como assegurar o trânsito inofensivo de
332 proteínas danificadas (88). Dado que a interação entre a HSP90 e receptores hormonais
333 é um elemento chave na ativação hormônio dependente de HSF-1 (89), o produto
334 transcricional resultante desta ativação pode ser outras famílias de HSPs (e.g. HSP70).

335 Durante o processo de envelhecimento existe o maciço acúmulo de proteínas
336 danificadas ou desdobradas que são capazes de gerar uma sobrecarga para manutenção
337 da proteostase no endotélio vascular. A redução de HSPs com o envelhecimento é fator
338 fundamental para que esta disfunção se inicie. Com o prejuízo da função primária, e mais
339 elementar das proteínas de choque térmico (chaperona), a proteção do ambiente
340 intracelular contra a ação de proteínas malformadas e a modulação
341 (ativação/desativação) de outras proteínas (complexos enzimáticos e fatores de
342 transcrição), leva à redução das defesas constitutivas da célula (90, 91). Este conjunto
343 de evidências suporta a hipótese de que exista alguma resposta fisiológica natural para
344 compensar este desequilíbrio. Uma vez que o estradiol atua como maestro de todo
345 ambiente homeostático do vaso até a menopausa, resta saber o que naturalmente o
346 substitui?

347 Neste sentido, a modulação do NF- κ B entra na lista de evidências como elemento
348 chave na resposta/potencialização do processo inflamatório na ausência de estrogênio
349 (pós menopausa). No processo natural de envelhecimento, o aparelho cardiovascular,
350 em ambos os sexos, apresentam aumento da resposta apoptótica e inflamação, bem como
351 alterações significativas na sinalização NF- κ B relacionadas à idade (92). Existem
352 evidências de que a relação entre o estrogênio e NF κ B leva à indução de HSF1. Com
353 isso, o estradiol pode inibir a atividade de NF- κ B via produção de HSP70 (93). Ao passo

354 que, o estrogênio, via seu receptor (subtipo β - ER β) bloqueia a subunidade p65 do fator
355 de transcrição, e ainda ativa a transcrição de I κ B α , criando uma alça de supressão,
356 enquanto há hormônio disponível. Conforme sugerido na hipótese da **figura 1**, cabe
357 pensar que episódios de fogacho podem induzir a produção de HSP70, a partir de um
358 choque térmico metabólico para o leito vascular, a fim de expressar não só HSP70, mas
359 também HSF1 para reestabelecer o controle homeostático anti-inflamatório regido pelo
360 estrogênio em mulheres nos períodos peri e pós-menopausa?

361 Muitos estudos sugerem que HSP70 é fundamental, como um dos elementos chave
362 no mecanismo de defesa vascular, e isso ocorreria diretamente sobre as células
363 endoteliais, com destaque ao potencial papel anti-inflamatório que pode atenuar a
364 aterosclerose (94 – 96). Do mesmo modo, outras interações metabólicas, passivas de
365 disfunção no climatério, são moduladas por estrogênio. A rápida sinalização do
366 hormônio (MISS – membrane initiated steroid signaling) está relacionada com ambos
367 receptores, α e β , localizados na membrana plasmática. Sabe-se que tanto HSP70,
368 quanto HSP90 estão envolvidas neste processo. Porém, pouco se conhece sobre a relação
369 entre a expressão de HSPs e os receptores de estrogênio, os quais são ativos também
370 independente de ligante (97). Interessantemente, estudos com inibidores seletivos de ER β
371 foram capazes de reduzir o número de fogachos (98). Isto corrobora com a hipótese de
372 que no meio celular privado de estrogênio, outros elementos, a priori, “controlados” pelo
373 hormônio, levem o organismo a desencadear um processo reparador para a falta da
374 molécula central – 17 β -estradiol. A ativação de diferentes vias de sinalização, estradiol
375 dependentes, no endotélio vascular, ocorrem a partir de proteínas kinase, como as
376 Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs), fosfatidilinositol 3 -kinase (PI3K),
377 Proteína kinase C (PKC) e fosfatases. Com isso, outros complexos para a produção de
378 metabólitos (e.g. biodisponibilidade de aminas cíclicas - cAMP, cGMP) também

379 encontram-se “órfãos” do esteroides durante o climatério. Este grande desarranjo
380 metabólico endotelial irá refletir na modificações na síntese de muitas proteínas, em nível
381 pós-translacional, especialmente por fosforilação. Como resultado, enzimas serão
382 rapidamente moduladas/inativadas e defesas celulares ficarão reduzidas, devido a
383 diminuta expressão das chaperonas na menopausa (64, 99). A função do fogacho de
384 suprir a ausência de estrogênio, levando a indução de HSPs (e.g. HSP70 e HSP90) pela
385 hipótese aqui apresentada, poderia modular também receptores de estrogênio
386 localizados na membrana plasmática das células endoteliais. A ação coordenada de
387 possíveis proteínas fogacho-induzíveis poderão manter a atividade de rotas vitais para a
388 célula. Neste sentido, a via de sinalização PI3-K/Akt, através da interação do ER α com
389 a subunidade p85 α reguladora do PI3-K levaria, a posteriori, a indução da oxido nítrico
390 sintase endotelial (eNOS) (100, 101), a qual é fortemente modulada por HSP70. Neste
391 contexto, é fundamental a manutenção da produção de óxido nítrico, devido ao
392 importante papel na homeostase vascular, e uma vez que sua produção esteja
393 comprometida, na ausência de estrogênio e HSP70 (ambos reduzidos na menopausa) o
394 NO passa a ser mais um fator a contribuir para a patogênese das DCV, principalmente
395 a aterosclerose e a hipertensão (102, 103).

396 Contudo, o papel fisiológico dos fogachos pode ser, efetivamente, a indução de
397 HSP70. Os fogachos apresentam relação com alterações no controle da temperatura
398 corporal pelo hipotálamo (104), na região de neurônios termossensíveis (105). Por outro
399 lado, a expressão de proteínas de choque térmico da família de 70 kDa (HSP70), cuja
400 função está relacionada à proteção intracelular, é dependente da temperatura (106),
401 tanto no SNC, como no sistema cardiovascular, em especial no arco aórtico de ratas
402 OVX (Miragem et al. 2015; submetido ao Mol. Cell. Biochem.). Além disso, a expressão
403 de HSP70 no hipotálamo ventromedial é positivamente regulada por estrogênios, sendo

404 *que o estradiol influencia a atividade dos receptores de progesterona, andrógenos e de*
405 *glicocorticoides através da expressão de HSP70 (57)*

406

407 ***Hipertermia e menopausa***

408 *De fato, a menopausa está ocorrendo em um ambiente de envelhecimento*
409 *cerebral. Neste contexto, a presença de estrogênio no hipotálamo modulou*
410 *morfologicamente a neuroplasticidade (espinhos dendríticos) em modelo animal de*
411 *primatas não-humanos (107). Estudos demonstram que existe uma redução substancial*
412 *na sensibilidade ao estrogênio no eixo hipotálamo-hipófise com o avanço da idade (108).*
413 *De forma concomitante, ocorre a diminuição da expressão de ER β em alguns áreas do*
414 *hipotálamo (109).*

415 *A senescência do sistema neuroendócrino, presente na menopausa, tem impacto*
416 *na auto regulação hipotalâmica, dentre outras, na termorregulação. O hipotálamo,*
417 *independente da atividade do eixo gonadal, também responde ao estrogênio em*
418 *estruturas fora dos núcleos de GnRH. Consideremos que este envelhecimento funcional*
419 *do hipotálamo leva a diversas vulnerabilidades regulatória, dentre elas a térmica, o que*
420 *se reflete, dentro do período da transição menopáusic, no surgimento de episódios de*
421 *fogacho e suores noturnos (108).*

422 *Por outro lado, a indução da expressão de HSP70 está fortemente prejudicada*
423 *pela redução dos níveis de HSF, ou pela disfunção decorrente da (in)ativação de HSF1*
424 *(110, 111), comprometendo a Heat Shock Response no sistema nervoso central (SNC),*
425 *principalmente em nível hipotalâmico. De forma controversa, Bodega et al.*
426 *demonstraram que a expressão de HSP70 no hipotálamo é a que apresenta menor*
427 *decrécimo decorrente do envelhecimento quando comparado com outras regiões do*
428 *SNC, como o córtex, cerebelo e hipocampo (112)*

429 Assim, podemos perceber que a própria evolução da perda das funções
430 reguladoras homeostáticas celulares (via chaperonas) é ao natural preservada no
431 hipotálamo. Mesmo que o mecanismo de resposta ao estresse, via HSP70, pareça estar
432 reduzido de forma mais lenta no hipotálamo, temos uma desregulação das defesas
433 antioxidantes que, além de ativar HSP70 em resposta ao estresse oxidativo, pode
434 comprometer a sobrevivência de neurônios termossensíveis. Muitos estudos propõem que a
435 modulação do envelhecimento hipotalâmico junto ao eixo reprodutivo ocorra, via
436 sinapses glutamatérgicas, através de receptores NMDA (rNMDA). A ativação/inibição
437 destes receptores controlam, além da liberação de GnRH, a expressão gênica e apoptose,
438 relacionadas à função reprodutiva (113 – 118). Assim, alterações em rNMDA no
439 hipotálamo podem levar a uma disfunção ovariana, e de forma parácrina pode contribuir
440 para alterações na função termorreguladora.

441 Interessantemente, a alça de feedback do eixo HHOv (remodelada na menopausa)
442 não ocorre em neurônios GnRH, uma vez que, os $ER\alpha$ e receptores de progesterona (PR),
443 tem expressões extremamente reduzidas no núcleo gonadotrófico (119, 120). Apesar de
444 neurônios GnRH coexpressar o $ER\beta$ (121), estes encontram-se em níveis baixos e sem
445 relação com a atividade reprodutiva (122). De forma interessante, outros núcleos
446 hipotalâmicos, como a área pré-óptica (termorreguladora), que possui intensa
447 comunicação com neurônios GnRH expressam receptores esteroides nucleares, e este
448 parece a ser o mecanismo mais importante para modulação do controle térmico em
449 função do eixo HHOv (123).

450 A atividade de E2 nos centros reguladores associados aos distúrbios do
451 climatério (área pré-óptica; córtex; hipocampo e neurônios corticais) ocorre via ERs,
452 tanto aos associados à membrana plasmática e membrana mitocondrial, quanto aos
453 nucleares (124 – 127). A cascata ativada a partir do ER da membrana destes núcleos

454 neurais, por sua vez, pode ligar e ativar a via PI3K/PKC, o que leva ao influxo de Ca^{++}
455 (128 – 131). Em seguida ocorre a fosforilação de Src (proto-oncogene tyrosine-protein
456 kinase Src) para ativar a via da MAP quinase quinase (MEK) que ativa ERK (ERK1/2),
457 a qual após ativada, resulta na transcrição de genes pró-inflamatórios (132, 133). Tanto
458 HSP70, quanto HSP90 possuem papéis centrais no controle destas disfunções celulares.
459 A modulação, via heat shock response, ocorre através de alterações na expressão de
460 HSF1 e diretamente sobre a atividade de moléculas como ERK, JNK1/2, and Bcl-2 (134).
461 Modulação símile à conduzida pelos ERs, os quais restam reduzidos na transição
462 menopáusica, e exercem ações centrais na regulação do eixo HHOv (hipotalamo-
463 hipofise-ovários). Assim, uma vez reduzida a atividade de E2, a cascata de sinalização
464 de Src/ERK, a qual levaria ao aumento da atividade e expressão dos NMDAr
465 glutamatérgicos, com conseqüente controle sobre a morfogênese neuronal e
466 neuroregulação (e.g. térmica, sono e humor) estão comprometidas (135 – 139). Como
467 principais resultados da privação hormonal, neurônios do núcleo hipotalâmico
468 termorregulador sofreriam, a partir da atividade nuclear de pERK (fosforilada), uma
469 resposta transcricional de CREB (cAMP response element-binding protein) para
470 aumentar a expressão dos genes anti-apoptóticos Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma) e Bcl-xl
471 (140 – 142). Em contrapartida, a interação de ER com o a subunidade p85 do PI3K,
472 potencializaria a via pAkt, e como resultado a fosforilação da proteína pró-apoptótica
473 BAD (Bcl-2 - associated death protein) (129, 143).

474 Por isso, não se pode descartar a possibilidade de que, durante o climatério, os
475 episódios de fogacho possam ocorrer para suprir a queda de temperatura decorrente da
476 redução de estrogênios circulantes, no sentido de restabelecer a correta expressão de
477 HSP70 (que responde a aumentos de temperatura), e que é necessária para o equilíbrio
478 da atividade dos hormônios ovarianos. Evento que pode ocorrer em nível hipotalâmico

479 *devido a sensível e complexa inter-relação dos núcleos neuro reguladores estradiol*
480 *dependentes e também modulados pela atividade das HSPs.*

481 *Haja vista a carência de estudos que abordem os efeitos metabólicos dos fogachos*
482 *e sua correlação com marcadores fisiológicos (e.g. inflamatórios), bem como a hipótese*
483 *de possíveis benefícios citoprotetores destes eventos, busca-se explicar em modelos*
484 *animais (ensaios em andamento em nosso laboratório) e em humanos (ensaio clínico*
485 *randomizado em planejamento pelo nosso grupo) o efeito da privação de estrogênios e*
486 *dos fogachos sobre a expressão e atividade da HSP70, e suas implicações na heat shock*
487 *response, em especial na aorta.*

488

489 ***Implicações, perspectivas e predições***

490 *Atualmente, é consenso que a disfunção endotelial inflamatória é o evento inicial*
491 *para o desenvolvimento da aterosclerose. O claro entendimento da correlação entre o*
492 *distúrbio endotelial e a lesão vascular proporcionará avanços nos estudos da*
493 *fisiopatologia da aterosclerose. Em decorrência disso, diferentes evidências sugerem que*
494 *as intervenções nas células endoteliais possam agir, tanto como inibidores do progresso*
495 *da lesão tecidual e do risco de eventos cardiovasculares (144), como também são capazes*
496 *de induzir cura total em modelos de aterosclerose em camundongos (96). Neste contexto,*
497 *a expressão de proteínas de choque térmico na aorta, especialmente de 70 kDa (HSP70)*
498 *tem papel anti-inflamatório importante no combate ao desenvolvimento da DCV (Bruxel*
499 *et al. – manuscrito em preparação) e sua modulação em um ambiente privado de*
500 *estrogênio (que é indutor de HSP70) pode levar o organismo a buscar outros estímulos*
501 *endógenos, como os fogachos para reparar esta disfunção relacionada à menopausa.*
502 *Contudo, a avaliação do status proteico durante eventos característicos da menopausa,*
503 *em humanos e modelos animais, trará novas possibilidades para a prática clínica. Além*

504 *disso, avanços no contexto da terapia térmica irão contribuir para construção de*
505 *estratégias terapêuticas não farmacológicas para a prevenção de doenças*
506 *cardiovasculares, bem como a melhoria da qualidade de vida de mulheres pós-*
507 *menopausa. Assim, tendo em vista que o calor induz HSP70, e que os estrogênios induzem*
508 *HSP70, surgiu a hipótese de que, na ausência de estrogênios, o hipotálamo pudesse subir*
509 *a temperatura corpórea no sentido de restabelecer a expressão HSP70 e,*
510 *consequentemente, uma resposta anti-inflamatória centrada na HSP70.*

511 *Recentes estudos em nosso laboratório, observaram que a razão (R) entre o*
512 *conteúdo plasmático de HSP70 (eHSP70 - extracelular) e o do citoplasma de linfócitos*
513 *(iHSP70 - intracelular) pode ser um instrumento interessante para a predição do status*
514 *inflamatório de ratos submetidos à exercício agudo, onde $R = [eHSP70]/[iHSP70] = 1$*
515 *para animais controles em repouso, de tal modo que detectou-se elevada alteração*
516 *positiva desta razão para os animais que apresentaram altos índices de marcadores*
517 *inflamatórios (e.g. NF- κ B) (Heck et al., manuscrito em preparação).*

518 *Acreditamos que alterações na razão entre HSP70 extra e intracelular seja um*
519 *potencial novo biomarcador para a inflamação, além de apresentar alta sensibilidade às*
520 *alterações metabólicas decorrente disto (145). Temos que, as disfunções ocasionadas*
521 *pelo climatério são respostas (sinais e sintomas) do organismo que antecedem o*
522 *desenvolvimento das doenças comuns as mulheres acima de 50 anos (e.g. disfunção*
523 *metabólica e obesidade; diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares,*
524 *principalmente, aterosclerose), as quais apresentam como ponto central um processo*
525 *inflamatório. Assim, a partir da capacidade que HSP70 apresenta de induzir diferentes*
526 *respostas inflamatórias dependendo de sua localização (intra ou extracelular),*
527 *sugerimos que avaliar o status de HSP70 de mulheres no climatério/menopausa, através*
528 *do cálculo da razão proposta (valores de R), poderá trazer informações importantes*

529 *sobre a evolução metabólica do envelhecimento destas mulheres, uma vez que tais*
530 *valores podem ser facilmente calculados a partir da razão entre a matriz extracelular*
531 *(plasma) e intracelular (e.g. leucócitos circulantes do sangue ou células mononucleares)*
532 *obtidos facilmente em uma amostra de sangue durante a consulta ambulatorial.*

533 *No que tange à resposta térmica menopáusicas (fogacho), sugerimos que ao*
534 *observar este parâmetro, teremos uma correlação diretamente proporcional ao status de*
535 *HSP70, uma vez que, quanto maior o R, acreditamos que maior será a intensidade e/ou*
536 *frequência dos fogachos. Logo, o monitoramento contribuirá como um importante*
537 *indicador de risco para estas mulheres, bem como um preditor da susceptibilidade ao*
538 *surgimento das doenças relacionadas. Inúmeros estudos demonstraram que hot tub*
539 *(146), sauna (147, 148), manta térmica (149, 150) e banho de imersão em água quente*
540 *(151, 152), apresentaram resultados positivos em humanos e modelos animais de*
541 *diabetes e síndrome metabólica. Dentre as respostas foram encontradas a redução da*
542 *P.A.; redução da fosforilação de JNK e IKK β ; redução de LDL e aumento de HDL*
543 *colesterol, dentre outros.*

544 *Como intervenção primária, propomos a terapia térmica, indutora de HSP70,*
545 *como a chave para minimizar os sintomas vasomotores do climatério. Assim, nossa*
546 *hipótese prediz que mulheres no período de transição menopáusicas, quando submetidas*
547 *a tratamento térmico (e.g. hot tubs ou sauna), apresentarão um aumento nos níveis de*
548 *iHSP70 de forma sistêmica, e conseqüente redução da razão R ($R = [eHSP70]/[iHSP70]$*
549 *= 1, para assintomáticas para fogachos), mantendo assim as condições mínimas para*
550 *uma heat shock response eficiente, tanto em nível hipotalâmico, quanto em nível vascular.*
551 *Com sobreposição de efeitos benéficos, deverá ocorrer cessação/redução dos sintomas*
552 *vasomotores, a priori, e demais sintomas de ordem secundária neste contexto em especial.*
553

554 **Funding**

555 This work was partially supported by grants received from the Brazilian National Council for Scientific
556 and Technological Development (CNPq): grants from MCT/CNPq, MS/DECIT, CT-CIOTEC and
557 CTSaúde, process #551097/2007-8, 563870/2010-9, 402626/2012-5 and 402364/2012-0, to PIHB. AAM
558 was supported by the State of Rio Grande Foundation for Research Support (FAPERGS). The authors have
559 agreed to the submission and had final approval of the submitted and published versions.
560

561 **Conflicts of interest statement**

562 No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

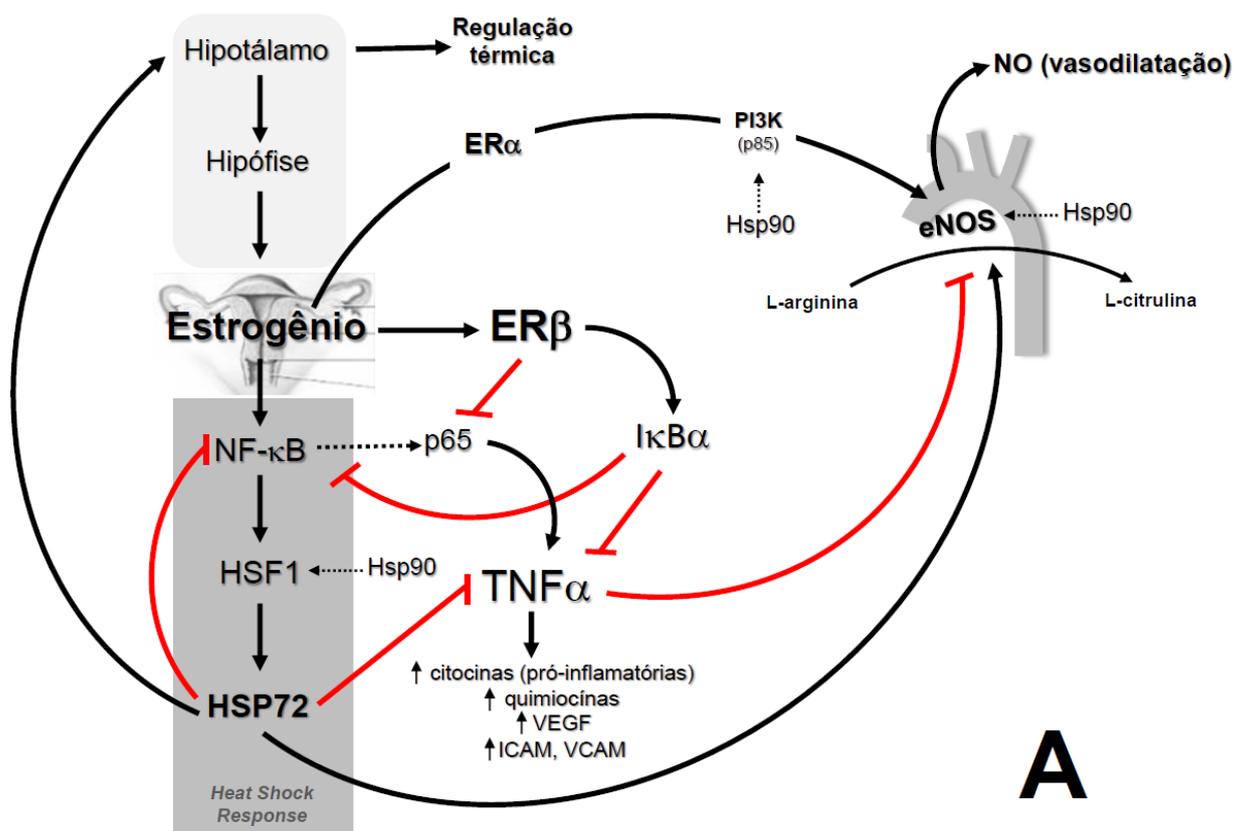
563

564 **Figura 1. (A)** A hipótese Fogacho/HSP70. No período pré-menopausa, a estrutura do
 565 eixo hipotálamo-hipófise-ovários (HHOv) está preservada. A partir da produção normal
 566 de estrogênio (E2) pelos ovários, ocorre a indução de HSP70, via HSR (Heat Shock
 567 Response), mediada pela ativação de NF- κ B que induz a expressão de HSF1. HSP70 atua
 568 como elemento chave no mecanismo de feedback positivo sobre o hipotálamo, modulando
 569 a resposta anti-inflamatório de estradiol. E2, via ER α , induz a síntese da eNOS nos vasos,
 570 pela ativação da subunidade p85 do PI3K, em especial no arco aórtico. eNOS produz
 571 NO pela conversão de L-arginina em L-citrulina. O estrogênio, ainda potencializa a ação
 572 inibidora de I κ B α sobre a atividade de TNF α e NF- κ B. Em contrapartida, a subunidade
 573 p65 de NF- κ B ativa TNF α , que leva a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (DNA).
 574 HSP72 é capaz de inibir tanto NF- κ B, quanto TNF α , exercendo suas propriedades anti-
 575 inflamatórias, também induz a expressão de eNOS no endotélio vascular. TNF α atua
 576 como inibidor de eNOS, diminuindo a contratilidade do vaso (mecanismo inflamatório).
 577 HSF1, eNOS e ER α são coativados na presença de HSP90. **(B)** Durante a transição
 578 menopáusicas ocorre a diminuição da produção de estrogênio (falência ovariana), que
 579 resulta na redução acentuada da capacidade de Heat Shock Response do organismo. A
 580 redução exacerbada de estrogênio soma-se a diminuição da capacidade do organismo
 581 de expressar HSP70, perdendo os recursos inibitórios das vias pró-inflamatórias (NF-
 582 κ B e TNF α). Reduz também a indução da síntese de eNOS, via ER α , o que leva ao
 583 processo de disfunção endotelial, potencializado pelo aumento da capacidade inibitória
 584 de TNF α sobre a enzima vascular, o qual encontra-se com a própria inibição diminuída
 585 pelo enfraquecimento da Heat Shock Response. **(C)** Com a intervenção através da sessão
 586 de choque térmico, ocorrerá uma resposta anti-inflamatória centrada na HSP70,
 587 reestabelecendo a capacidade de Heat Shock Response do organismo. A partir da
 588 expressão aumentada, via choque térmico, de HSP70, ocorrerá a reativação do recurso
 589 inibitório das vias pró-inflamatórias (NF- κ B e TNF α). Especialmente no vaso (aorta),
 590 ocorreria a recuperação de uma das vias de indução da síntese de eNOS, independente
 591 do ER α , o que minimiza, a curto prazo, o processo de disfunção endotelial, pela
 592 deficiência de produção de NO e ainda, potencializado pela redução da capacidade
 593 inibitória de TNF α sobre a enzima vascular. E ainda, a expressão de HSP70 pode
 594 resultar num mecanismo de feedback hipotalâmico para a modulação do controle
 595 térmico (efeitos do tratamento térmico: conexões azuis).

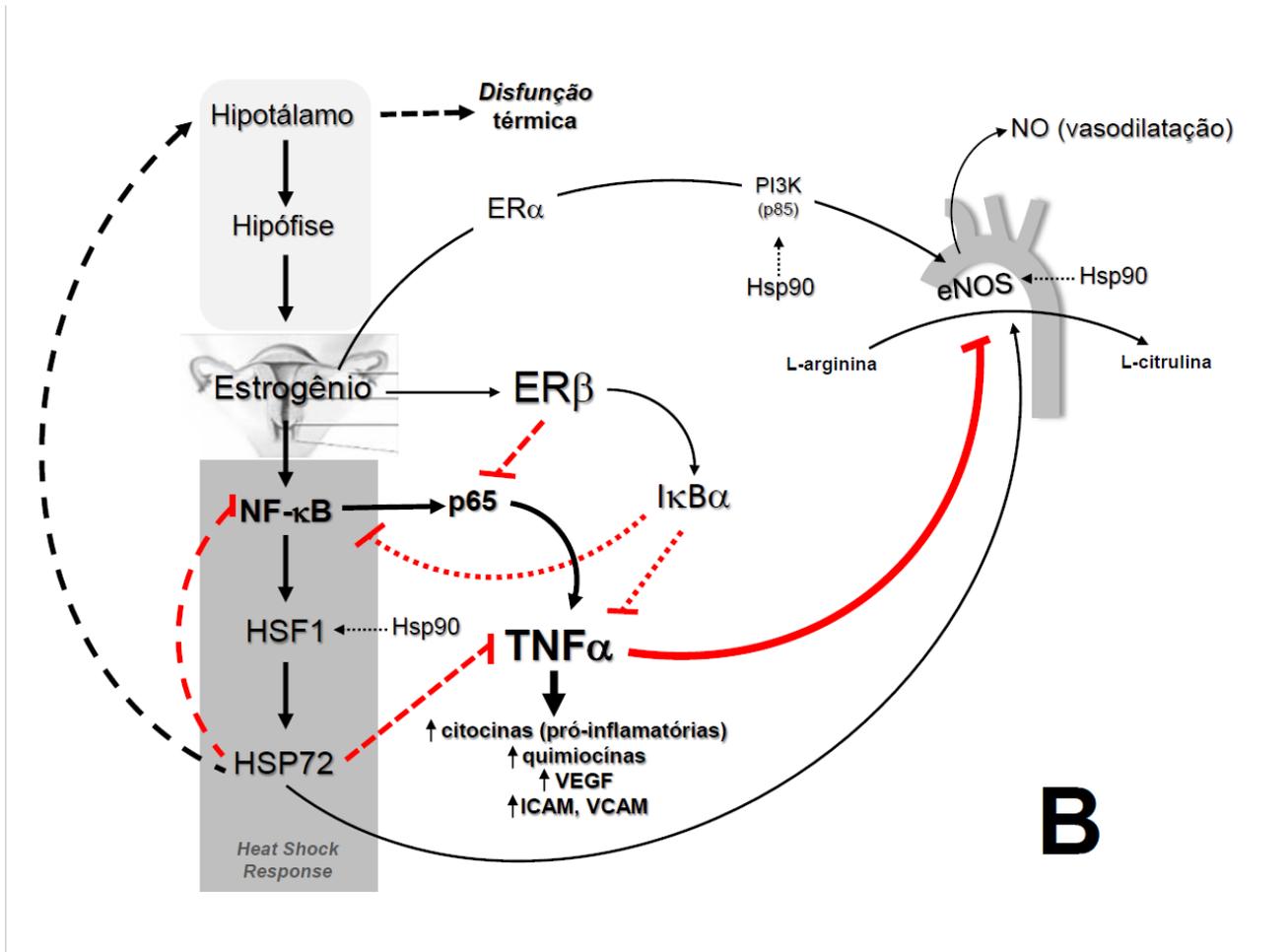
596
 597 **HSP70:** 70 kDa heat shock protein; **HSF1:** heat shock transcription factor-1; **eNOS:**
 598 endothelial nitric oxide synthase (NOS2); **TNF α :** tumor necrosis factor-alpha; **NF- κ B:**
 599 nuclear transcription factors from the κ light chain enhancer of activated B cells
 600 family; **ER:** estrogen receptor; **PI3K:** phosphoinositide 3-kinase

601
 602

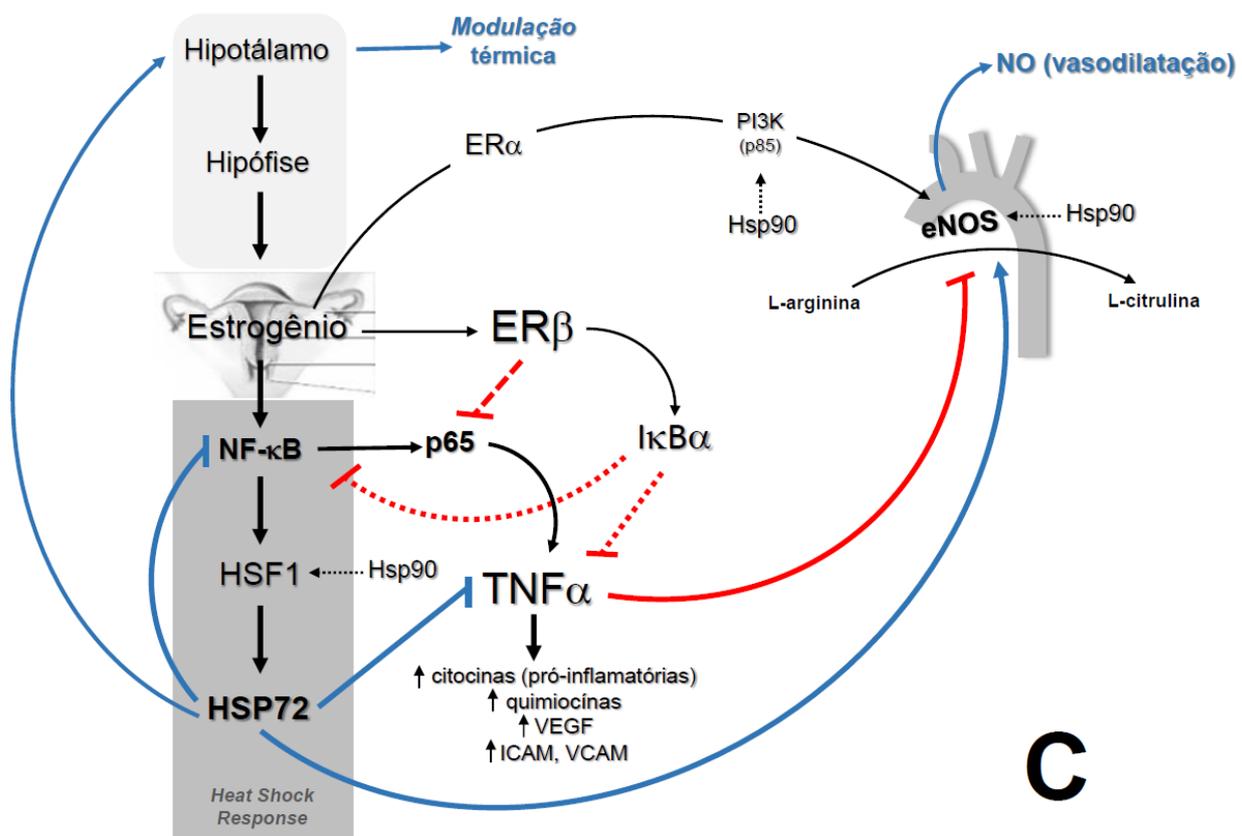
603 (Figura 1 inserida a seguir)



A



605



C

607 *Referências*

608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661

1. Christensen K, Doblhammer G, Rau R and Vaupel JW. Aging populations: the challenges ahead. *Lancet* 2009; 374(9696):1196–1208.
2. Hill K. The demography of menopause. *Maturitas* 1996; 23:113-127.
3. WHO Scientific Group on Research on the Menopause in the 1990s. Geneva, WHO technical report series; 866,1-107, 1996.
4. Sowers MFR, Zheng H, McConnell D, Nan B, Harlow S and Randolph Jr JF. Follicle Stimulating Hormone and Its Rate of Change in Defining Menopause Transition Stages. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:3958–64.
5. Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W, et al. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Fertility and Sterility* 2001; 76 (5): 874-78.
6. WHI - Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA* 2002; 288:321-33
7. Hulley S, Furberg C, Barrett-Connor E, Cauley J, Grady D, Haskell W, Knopp R, Lowery M, Satterfield S, Schrott H, Vittinghoff E, Hunninghake D; HERS Research Group. Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002; 3 288(1):58-66.
8. North American Menopause Society: Treatment of menopause-associated vasomotor symptoms: Position statement. *Menopause* 2004; 2:11–33.
9. Bosworth HB, Bastian LA, Kuchibhatla MN, Steffens DC, McBride CM, Skinner CS, Rimer BK, Siegler IC. Depressive symptoms, menopausal status, and climacteric symptoms in women at midlife. *Psychosom Med.* 2001; 63(4):603-8.
10. Dennerstein L, Dudley EC, Hopper JL, Guthrie JR, Burger HG: A prospective population-based study of menopausal symptoms. *Obstetrics & Gynecology* 2000; 96:351–358.
11. Daley A, MacArthur C, McManus R, et al. Factors associated with the use of complementary medicine and non-pharmacological interventions in symptomatic menopausal women. *Climateric* 2006; 9(5):336–346.
12. Bernis C and Reher DS, Environmental contexts of menopause in Spain: comparative results from recente research. *Menopause* 2007; 14: 777–87.
13. Utian WH, Psychosocial and socioeconomic burden of vasomotor symptoms in menopause: a comprehensive review. *Health and Quality of Life Outcomes* 2005; 3: 47.
14. Morimoto RI, Tissieres A et al. *Stress Protein in Biology and Medicine*. New York: Cold Spring Harbor 1990. 450 p. (Monograph Series)
15. Mackowiak, PA. Concepts of fever. *Arch Intern Med.* 1998 Sep 28;158(17):1870-81.
16. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Oct;1(4):a000034. doi: 10.1101/cshperspect.a000034.
17. Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Dev.* 1998. 12:3788-3796 doi:10.1101/gad.12.24.3788
18. Singh IS, Hasday JD. Fever, hyperthermia and the heat shock response. *Int J Hyperthermia.* 2013 Aug;29(5):423-35. doi: 10.3109/02656736.2013.808766.
19. Lindquist S, Craig EA. The Heat-Shock Proteins. *Annual Review of Genetics*, 1988 Vol. 22: 631-677 DOI: 10.1146/annurev.ge.22.120188.003215
20. Krause MS, Oliveira Jr LP, Silveira EM, Vianna DR, Rossato JS, Almeida BS, et al. MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells? *Cell Biochem Funct* 2007;25:23–32.
21. Patel B, Khaliq A, Jarvis-Evans J, Boulton M, Arrol S, Mackness M, et al. Hypoxia induces HSP 70 gene expression in human hepatoma (HEP G2) cells. *Biochem Mol Biol Int* 1995;36:907–12.
22. Collins PL, Hightower LE. Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat shock) mRNAs and proteins. *J Virol* 1982;44:703–7.
23. Said Ali K, Ferencz A, Nemcsok J, Hermes E. Expressions of heat shock and metallothionein genes in the heart of common carp (*Cyprinus carpio*): effects of temperature shock and heavy metal exposure. *Acta Biol Hung* 2010;61:10–23.

- 662 24. Richard V, Kaeffer N, Thuillez C. Delayed protection of the ischemic heart – from
663 pathophysiology to therapeutic applications. *Fundam Clin Pharmacol* 1996;10:409–15
- 664 25. Beckmann RP, Michelle Lovett M and Welch WJ. Examining the Function and Regulation of hsp
665 70 in Cells Subjected to Metabolic Stress *J Cell Biol* 1992 June 15, vol. 117 no. 6 1137-1150
- 666 26. Nadeau, D., S. Corneu, I. Plante, G. Morrow and R.M. Tanguay (2001) Evaluation of HSP 70 as
667 a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Stress Chaperones*
668 6, 153-163.
- 669 27. Mukhopadhyay I, Nazir A, Saxena DK, and Chowdhuri DK. Heat Shock Response: hsp70 in
670 Environmental Monitoring. *J Biochem Molecular Toxicology* Volume 17, Number 5, 2003.
- 671 28. Anckar J, Sistonen L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in
672 aging and disease. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:1089-115. doi: 10.1146/annurev-biochem-
673 060809-095203
- 674 29. de Thonel A, Le Mouël A, Mezger V. Transcriptional regulation of small HSP-HSF1 and beyond.
675 *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Oct;44(10):1593-612. doi:10.1016/j.biocel.2012.06.012.
- 676 30. Tang S, Buriro R, Liu Z, Zhang M, Ali I, Adam A, Hartung J, Bao E. Localization and expression
677 of Hsp27 and α B-crystallin in rat primary myocardial cells during heat stress in vitro. *PLoS One.*
678 2013 Jul 19;8(7):e69066. doi: 10.1371/journal.pone.0069066.
- 679 31. Chen HW, Kuo HT, Wang SJ, Lu TS, Yang RC. In vivo heat shock protein assembles with septic
680 liver NF- κ B/I- κ B complex regulating NF- κ B activity. *Shock.* 2005 Sep;24(3):232-8. •In this
681 manuscript, it was demonstrated that HSP72 can mount onto NF κ B thus impeding its migration
682 to the nucleus and the consequent transcribing activity.
- 683 32. Newsholme P and Homem de Bittencourt PI, Jr. The fat cell senescence hypothesis: a mechanism
684 responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. *Curr Opin Clin Nutr*
685 *Metab Care* 2014; 17:295-305. doi: 10.1097/MCO.0000000000000077
- 686 33. Gutierrez LL, Maslinkiewicz A, Curi R, Homem de Bittencourt PI Jr. Atherosclerosis: a redox-
687 sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. *Biochem Pharmacol.*
688 2008 Jun 15;75(12):2245-62. doi: 10.1016/j.bcp.2008.03.002.
- 689 34. Rossi A1, Elia G, Santoro MG. Inhibition of nuclear factor kappa B by prostaglandin A1: an effect
690 associated with heat shock transcription factor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jan
691 21;94(2):746-50.
- 692 35. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG. Anti-inflammatory
693 cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature.* 2000 Jan
694 6;403(6765):103-8. ••In this classic manuscript, the mechanism by which cyPGs present their well
695 known and powerful anti-inflammatory effect is shown to be mediated by the direct cyPG-elicited
696 inhibition of I κ B kinase- β (IKK β) in a HSP70-collaborative manner.
- 697 36. Rossi A, Coccia M, Trotta E, Angelini M, Santoro MG. Regulation of cyclooxygenase-2
698 expression by heat: a novel aspect of heat shock factor 1 function in human cells. *PLoS One.*
699 2012;7(2):e31304. doi: 10.1371/journal.pone.0031304.
- 700 37. Kurucz I, Morva A, Vaag A, Eriksson KF, Huang X, Groop L, Koranyi L. Decreased expression
701 of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin
702 resistance. *Diabetes.* 2002 Apr;51(4):1102-9.
- 703 38. Rodrigues-Krause J, Krause M, O'Hagan C, De Vito G, Boreham C, Murphy C, Newsholme P,
704 Colleran G. Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat
705 matter? *Cell Stress Chaperones.* 2012 May;17(3):293-302. doi: 10.1007/s12192-011-0319-x.
- 706 39. Bruce CR, Carey AL, Hawley JA, Febbraio MA. Intramuscular heat shock protein 72 and heme
707 oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance
708 is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. *Diabetes.* 2003 Sep;52(9):2338-45.
- 709 40. Di Naso FC, Porto RR, Fillmann HS, Maggioni L, Padoin AV, Ramos RJ, Mottin CC, Bittencourt
710 A, Marroni NA, de Bittencourt PI Jr. Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway,
711 contributing to NAFLD progression. *Obesity (Silver Spring).* 2015 Jan;23(1):120-9. doi:
712 10.1002/oby.20919.
- 713 41. Calapre L, Gray ES, Ziman M. Heat stress: a risk factor for skin carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2013
714 Aug 28;337(1):35-40. doi:10.1016/j.canlet.2013.05.039. Epub 2013 Jun 5.
- 715 42. Hooper PL, Balogh G, Rivas E, Kavanagh K, Vigh L. The importance of the cellular stress
716 response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones.* 2014 Feb
717 13. [Epub ahead of print]. Doi: 10.1007/s12192-014-0493-8.

- 718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
43. Krause MS, Bock PM, Takahashi HK, Homem de Bittencourt PI Jr., Newsholme P (2015) The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes. *Clin Sci* doi: 10.1042/CS20140695
 44. Singh IS, He JR, Calderwood S, Hasday JD. A high affinity HSF-1 binding site in the 5'-untranslated region of the murine tumor necrosis factor- α gene is a transcriptional repressor. *J Biol Chem* 2002; 277:4981–4988.
 45. Wu L, Hu C, Huang M, Jiang M, Lu L, Tang J. Heat shock transcription factor 1 attenuates TNF α -induced cardiomyocyte death through suppression of NF κ B pathway. *Gene*. 2013 Sep 15;527(1):89-94. doi: 10.1016/j.gene.2013.05.024. Epub 2013 Jun 12.
 46. Knowlton AA. NF κ B, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2006 Jan;69(1):7-8.
 47. Li H, Liu L, Xing D, Chen WR. Inhibition of the JNK/Bim pathway by Hsp70 prevents Bax activation in UV-induced apoptosis. *FEBS Lett*. 2010 Nov 19;584(22):4672-8. doi: 10.1016/j.febslet.2010.10.050.
 48. Velarde MC. Pleiotropic actions of estrogen: a mitochondrial matter. *Physiol. Genomics* 2013; 45:106-109 doi:10.1152/physiolgenomics.00155.2012
 49. Moggs JG, Orphanides G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep* 2001; 2(9):775-81.
 50. Subbiah MTR, Kessel B, Agrawal M, Rajan R, Abplanalp W, Rymaszewski Z. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1095-97.
 51. Sack MN, Rader DJ, Cannon RO. Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* 1994; 343:269-270.
 52. Guetta V, Panza JA, Waclawiw MA, Cannon RO. Effect of combined 17-beta estradiol and vitamin E on low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women. *Am J Cardiol* 1995; 75:1274-76.
 53. Brussard HE, Leuven JAG, Klufft C. Effect of 17-beta estradiol on plasma lipids and LDL oxidation in postmenopausal women with type II diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:324-330.
 54. Pellegrini M; Bulzomi P; Galluzzo P; Lecis M; Leone S; Pallottini V; Maria Marino. Naringenin modulates skeletal muscle differentiation via estrogen receptor α and β signal pathway regulation. *Genes Nutr* 2014; 9:425.
 55. Kim HJ, Oh YK, Lee JS, Lee D-Y, Choi D, Yoon B-K. Effect of Transdermal Estrogen Therapy on Bone Mineral Density in Postmenopausal Korean Women. *J Menopausal Med* 2014; 20:111-117.
 56. Kim JH, Cho HT, Kim YJ. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. *Endocr J*. 2014; 61(11):1055-67.
 57. Krebs CJ, Jarvis ED, Pfaff DW. The 70-kDa heat shock cognate protein (Hsc73) gene is enhanced by ovarian hormones in the ventromedial hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 16: 96(4): 1686-91.
 58. Meyer MR, Fredette NC, Howard TA, Hu C, Ramesh C, Daniel C, Amann K, Arterburn JB, Barton M, Prossnitz ER. G protein-coupled estrogen receptor protects from atherosclerosis. *Sci Rep* 2014; 23: 4:7564.
 59. Mueck AO, Seeger H, Wallwiener D. Medroxyprogesterone acetate versus norethisterone: effect on estradiol-induced changes of markers for endothelial function and atherosclerotic plaque characteristics in human female coronary endothelial cell cultures. *Menopause* 2002; 9: 273-281.
 60. Sobrino A, Oviedo PJ, Novella S, Laguna-Fernandez A, Bueno C, Garcia-Perez MA, Tarin JJ, Cano A, Hermenegildo C. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor. *J. Mol. Endocrinol* 2010; 44: 237-246.
 61. Hamilton KL, Mbai FN, Gupta S, Knowlton AA. Estrogen, Heat Shock Proteins, and NF κ B in Human Vascular Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ;24:1628-1633.
 62. Hamilton KS, Gupta S, Knowlton AA. Estrogen and Regulation of Heat Shock Protein Expression in Female Cardiomyocytes: Cross-talk with NF κ B Signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:579–586.
 63. Stice JP and Knowlton AA. Estrogen, NF κ B, and the Heat Shock Response. *Mol Med* 2008; 14(7-8): 517–527.

- 773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
64. Stice JP, Chen L, Kim S-C, Jung JS, Tran AL, Liu TT, Knowlton AA. 17 β -Estradiol, Aging, Inflammation, and the Stress Response in the Female Heart. *Endocrinology* 2011; 152(4): 1589–1598.
 65. Giannoni E, Guignard L, Reymond MK, Perreau M, Roth-Kleiner M, Calandra T, Roger T. Estradiol and Progesterone Strongly Inhibit the Innate Immune Response of Mononuclear Cells in Newborns *Infect Immun* 2011; 79(7): 2690–2698.
 66. Wick G, Bojana Jakic, Maja Buszko, Marius C. Wick and Cecilia Grundtman The role of heat shock proteins in atherosclerosis *Nat. Rev. Cardiol.* 2014; 11: 516–529 doi:10.1038/nrcardio.2014.91;
 67. Lu X and V. Kakkar. The Role of Heat Shock Protein (HSP) in Atherosclerosis: Pathophysiology and Clinical Opportunities *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17, 957-973
 68. Brocchieri L, Everly Conway de Macario, and Alberto JL Macario. Hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions *Evol Biol.* 2008; 8: 19.
 69. Voss MR, Stallone JN, Li M, Cornelussen RNM, Knuefermann P, Knowlton AA. Gender Differences in the Expression of Heat Shock Proteins: The Effect of Estrogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H687–H692.
 70. Koot RW, Amelink GJ, Blankenstein MA, and Baer PR. Tamoxifen and oestrogen both protect the rat muscle against physiological damage. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40: 689–695, 1991.
 71. Mendelsohn ME and Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340: 1801–1811, 1999.
 72. Paroo Z, Dipchand ES, Noble EG. Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Feb;282(2):C245-51.
 73. Freedman RR. Menopausal hot flashes: Mechanisms, endocrinology, treatment. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 142 (2014) 115–120
 74. Freeman EW, Sammel MD, Lin H, et al. Symptoms associated with menopausal transition and reproductive hormones in midlife women. *Obstet Gynecol.* 2007;110(2 Pt 1):230–240
 75. Stearns V, Ullmer L, López JF, Smith Y, Isaacs C, Hayes D. Hot flushes. *Lancet.* 2002 Dec 7;360(9348):1851-61.
 76. Erlik Y, Meldrum DR, Judd HL. Estrogen levels in postmenopausal women with hot flashes. *Obstet Gynecol.* 1982 Apr;59(4):403-7.
 77. Casper RF, S.S.C. Yen, M.M. Wilkes, Menopausal flushes: a neuroendocrine link with pulsatile luteinizing hormone secretion, *Science* 204 (1979) 823–825
 78. Tataryn IV, D.R. Meldrum, K.H. Lu, A.M. Frumar, H.L. Judd, LH, FSH, and skintemperature during menopausal hot flush, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49 (1979)152–154.
 79. Gambone J, D.R. Meldrum, L. Laufer, R.J. Chang, J.K.H. Lu, H.L. Judd, Further delineation of hypothalamic dysfunction responsible for menopausal hotflashes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59 (1984) 1097–1100.
 80. Tuomikoski P, Ebert P, Groop PH, Haapalahti P, Hautamäki H, Rönback M, Ylikorkala O, Mikkola TS. Evidence for a role of hot flushes in vascular function in recently postmenopausal women. *Obstet Gynecol.* 2009 Apr;113(4):902-8. doi: 10.1097/AOG.0b013e31819cac04.
 81. Arnal JF, P Gourdy, R Elhage, B Garmy-Susini, E Delmas, L Brouchet, C Castano, Y Barreira, J C Couloumiers, H Prats, A-C Prats and F Bayard. Estrogens and atherosclerosis. *European Journal of Endocrinology* (2004) 150 113–117
 82. Pockley G & Stuart K. Calderwood & Gabriele Multhoff The atheroprotective properties of Hsp70: a role for Hsp70-endothelial interactions? *Cell Stress and Chaperones* (2009) 14:545–553 DOI 10.1007/s12192-009-0113-1
 83. Sharron H. Francis, Jennifer L. Busch, and Jackie D. Corbin cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action *Pharmacological Reviews* 2010 vol. 62 no. 3525-563 doi: 10.1124/pr.110.002907
 84. Russell KS, Haynes MP, Caulin-Glaser T, Rosneck J, Sessa WC, Bender J. Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. Effects on calcium sensitivity and NO release. *J Biol Chem.* 2000;275:5026–5030.
 85. Takahashi S, Mendelsohn ME. Synergistic Activation of Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of AN HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem.* 2003;278:30821–30827.

- 829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
86. Chen JX, Meyrick B. Hypoxia increases HSP90 binding to eNOS via PI3K-Akt in porcine coronary artery endothelium. *Lab Invest.* 2004;84:182–190.
 87. Benjaminand IJ, D. R.McMillan, “Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease,” *Circulation Research*, vol. 83, no. 2, pp. 117–132, 1998.
 88. Storti S, S. Vittorini, M. R. Iacone et al., “Analysis of the variation in the hsp70-1 and hsp90alpha mRNA expression in human myocardial tissue that has undergone surgical stress,” *Cell Stress Chaperones*, vol. 8, no. 1, pp. 18–25, 2003.
 89. Knowlton AA, Sun L. Heat shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat shock protein expression in the heart. *Am J Physiol.* 2001;280:H455–H464.
 90. Balch WE, R. I.Morimoto,A.Dillin, and J.W. Kelly, “Adapting proteostasis for disease intervention,” *Science*, vol. 319, no. 5865, pp. 916–919, 2008.
 91. Swindell WR, M. M.Masternak, J. J. Kopchick, C. A. Conover, A. Bartke, and R. A.Miller, “Endocrine regulation of heat shock protein mRNA levels in long-lived dwarfmice,” *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 130, no. 6, pp. 393–400, 2009.
 92. Borrás C, J. Gambini, M. C. Gómez-Cabrera et al., “17betaoestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade,” *Aging Cell*, vol. 4, no. 3, pp. 113–118, 2005.
 93. Meldrum DR, M. Wang, B. M. Tsai et al., “Intracellular signaling mechanisms of sex hormones in acute myocardial inflammation and injury,” *Frontiers in Bioscience*, vol. 10, no. 2, pp. 1835–1867, 2005.
 94. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL (2002) Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med* 2002; 8:1218–1226.
 95. Hansson GK. Vaccination against atherosclerosis. Science or fiction? *Circulation* 2002; 106:1599–1601.
 96. Homem de Bittencourt PI Jr1, Lagranha DJ, Maslinkiewicz A, Senna SM, Tavares AM, Baldissera LP, Janner DR, Peralta JS, Bock PM, Gutierrez LL, Scola G, Heck TG, Krause MS, Cruz LA, Abdalla DS, Lagranha CJ, Lima T, Curi R. LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 2007; 193(2):245-58.
 97. Marino M, Paola Galluzzo, and Paolo Ascenzi. Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription *Curr Genomics.* 2006 Nov; 7(8): 497–508. PMID: PMC2269003
 98. Doshi SB and Ashok Agarwal The role of oxidative stress in menopause *Midlife Health.* 2013 Jul-Sep; 4(3): 140–146.
 99. Perillo B, Annarita Sasso, Ciro Abbondanza and Giuseppe Palumbo. 17β-Estradiol Inhibits Apoptosis in MCF-7 Cells, Inducing bcl-2 Expression via Two Estrogen-Responsive Elements Present in the Coding Sequence. *Mol Cell Biol.* 2000 Apr; 20(8): 2890–2901.
 100. Chen, Z., Yuhanna, I. S., GalchevaGargova, Z., Karas, R. H., Mendelsohn, M. E., and Shaul, P. W. (1999). Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J. Clin. Invest.* 103, 401–406.
 101. Chambliss, K. L., Yuhanna, I. S., Anderson, R. G., Mendelsohn, M. E. and Shaul, P. W. (2002) ERbeta has nongenomic action in caveolae *Mol Endocrinol* 16, 938-46.
 102. Boo YC and Jo H, Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Cell Physiology* 2003; 285: C499– C508.
 103. Nollen EA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing “heat shock” proteins. *J Cell Sci* 2002; 115:2809–2816
 104. Basta D, Tzschentke B, Nichelmann M. Temperature guardian neurons in the preoptic area of the hypothalamus. *Brain Res* 1997; 767:361–2.
 105. Lomax P, Schönbaum E. Postmenopausal hot flushes and their management. *Pharm Ther* 1993; 57:347–58.
 106. Heck TG, Schöler CM, Homem de Bittencourt Jr. PI. HSP70 expression: does it a novel fatigue signaling factor from immune system to the brain? *Cell Biochem Funct* 2011; 29(3):215-226.
 107. Rapp PR, Morrison JH, Roberts JA (2003) Cyclic estrogen replacement improves cognitive function in aged ovariectomized rhesus monkeys. *J Neurosci* 23:5708 –5714s).
 108. Weiss G, Skurnick JH, Goldsmith LT, Santoro NF, Park SJ. Menopause and hypothalamic-pituitary sensitivity to estrogen. *JAMA.* 2004 Dec 22;292(24):2991-6.

- 884 109.Chakraborty TR, Ng L, Gore AG. Age-related changes in estrogen receptor beta in rat
885 hypothalamus: a quantitative analysis. *Endocrinology*. 2003;144: 4164-4171.
- 886 110.Heydari AR, Takahashi R, Gutschmann A, You S, Richardson A. Hsp70 and aging. *Experientia*.
887 1994 Nov 30;50(11-12):1092-8. Review.
- 888 111.Heydari AR, You S, Takahashi R, Gutschmann-Conrad A, Sarge KD, Richardson A. Age-related
889 alterations in the activation of heat shock transcription factor 1 in rat hepatocytes. *Exp Cell Res*.
890 2000 Apr 10;256(1):83-93.
- 891 112.Bodega et al. HSP70 Constitutive Expression in Rat Central Nervous System from Postnatal
892 Development to Maturity. *J Histochem Cytochem* September 2002 vol. 50 no. 9 1161-1168
- 893 113.Bonavera JJ, Swerdloff RS, Hikim APS, Lue YH, Wang C (1998) Aging results in attenuated
894 gonadotropin releasing hormone-luteinizing hormone axis responsiveness to glutamate receptor
895 agonist N-methyl-D-aspartate. *J Neuroendocrinol* 10:93-99.
- 896 114.Gore AC, Yeung G, Morrison JH, Oung T (2000) Neuroendocrine aging in the female rat: the
897 changing relationship of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons and N-methyl-D-
898 aspartate receptors. *Endocrinology* 141:4757- 4767.
- 899 115.Gore AC, Oung T, Woller MJ (2002) Age-related changes in hypothalamic gonadotropin-
900 releasing hormone (GnRH) and NMDA receptor gene expression and their regulation by estrogen
901 in the female rat. *J Neuroendocrinol* 14:300 -309.
- 902 116.Gore AC (2001) Gonadotropin-releasing hormone neurons, NMDA receptors, and their regulation
903 by steroid hormones across the reproductive life cycle. *Brain Res Rev* 37:235-248.
- 904 117.Brann DW, Mahesh VB (2005) The aging reproductive neuroendocrine axis. *Steroids* 70:273-283
- 905 118.Yin W, Gore AC (2006) Neuroendocrine control of reproductive aging: roles of GnRH neurons.
906 *Reproduction* 131:403- 414
- 907 119.Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW (1983) Absence of oestradiol concentration in cell
908 nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 304:345-347
- 909 120.Herbison AE, Skinner DC, Robinson JE, King IS (1996) Androgen receptor-immunoreactive cells
910 in ram hypothalamus: distribution and colocalization patterns with gonadotropin-releasing
911 hormone, somatostatin and tyrosine hydroxylase. *Neuroendocrinology* 63:120 -131
- 912 121.Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL
913 (2000) Detection of estrogen receptor- β messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding in
914 luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*141:3506 -3509
- 915 122.Kudwa AE, Michopoulos V, Gatewood JD, Rissman EF (2006) Roles of estrogen receptors alpha
916 and beta in differentiation of mouse sexual behavior. *Neuroscience* 138:921-928.
- 917 123.Morrison JH,1 Roberta D. Brinton,2 Peter J. Schmidt,3 and Andrea C. Gore4 Estrogen,
918 Menopause, and the Aging Brain: How Basic Neuroscience Can Inform Hormone Therapy in
919 Women. *Journal of Neuroscience*, October 11, 2006 • 26(41):10332-10348
- 920 124.McEwen B, Akama K, Alves S, Brake WG, Bulloch K, Lee S, Li C, Yuen G, Milner TA (2001)
921 Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation.
922 *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7093-7100.
- 923 125.Toran-Allerand CD (2004) Minireview: a plethora of estrogen receptors in the brain: where will
924 it end? *Endocrinology* 145:1069 -1074.
- 925 126.Wu T, Chen S, Brinton RD (2004) Estrogen membrane receptor imaging coupled with estradiol
926 activation of intracellular calcium rise and ERK activation in single neurons. *Soc Neurosci Abstr*
927 30:659.20.
- 928 127.Milner TA, Ayoola K, Drake CT, Herrick SP, Tabori NE, McEwen BS, Warriar S, Alves SE
929 (2005) Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat
930 hippocampal formation. *J Comp Neurol* 491:81-95.
- 931 128.Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK (2000) Interaction of
932 oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*
933 407:538 -541.
- 934 129.Mannella P, Brinton RD (2006) Estrogen receptor protein interaction with PI3K leads to activation
935 of pAkt and pERK in the same population of cortical neurons: a unified mechanism of estrogen
936 action. *J Neurosci* 26:9439 -9447.
- 937 130.Cordey M, Gundimeda U, Gopalakrishna R, Pike CJ (2003) Estrogen activates protein kinase C
938 in neurons: role in neuroprotection. *J Neurochem* 84:1340 -1348.

- 939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
131. Setalo Jr G, Singh M, Nethrapalli IS, Toran-Allerand CD (2005) Protein kinase activity is necessary for estrogen-induced Erk phosphorylation in neocortical explants. *Neurochem Res* 30:779–790.
 132. Singh M, Setalo Jr G, Guan X, Frail DE, Toran-Allerand CD (2000) Estrogen-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor- α knock-out mice. *J Neurosci* 20:1694–1700.
 133. Nilsen J, Brinton RD (2003) Divergent impact of progesterone and medroxyprogesterone acetate (Provera) on nuclear mitogen-activated protein kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10506–10511.
 134. Padmini EI, Uthra V, Lavanya S. Effect of HSP70 and 90 in modulation of JNK, ERK expression in preeclamptic placental endothelial cell. *Cell Biochem Biophys*. 2012 Dec;64(3):187-95. doi: 10.1007/s12013-012-9371-0.
 135. Brinton RD, Proffitt P, Tran J, Luu R (1997) Equilin, a principal component of the estrogen replacement therapy premarin, increases the growth of cortical neurons via an NMDA receptor-dependent mechanism. *Exp Neurol* 147:211–220.
 136. Woolley CS, Weiland NG, McEwen BS, Schwartzkroin PA (1997) Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J Neurosci* 17:1848–1859.
 137. Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, Berger TW (1999) 17 β -estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J Neurophysiol* 81:925–929.
 138. Bi R, Broutman G, Foy MR, Thompson RF, Baudry M (2000) The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3602–3607.
 139. Nilsen J, Chen S, Brinton RD (2002) Dual action of estrogen on glutamate induced calcium signaling: mechanisms requiring interaction between estrogen receptors and src/mitogen activated protein kinase pathway. *Brain Res* 930:216–234.
 140. Garcia-Segura LM, Cardona-Gomez P, Naftolin F, Chowen JA (1998) Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *NeuroReport* 9:593–597.
 141. Pike CJ (1999) Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72:1552–1563.
 142. Wu TW, Wang JM, Chen S, Brinton RD (2005) 17 β -estradiol induced Ca²⁺ influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection. *Neuroscience* 135:59–72.
 143. Singh M (2001) Ovarian hormones elicit phosphorylation of Akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex. *Endocrine* 14:407–415.
 144. Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics* 2007;62(1):77-86.
 145. Krause MS, Heck TG, Bittencourt A., Scomazzon SP, Newsholme P, Curi R, Homem de Bittencourt PI Jr. (2015) The chaperone balance hypothesis: The importance of the Extracellular to Intracellular HSP70 Ratio (eHSP70/iHSP70) to inflammation-driven Type 2 Diabetes, the effect of exercise and the implications for clinical management. *Mediat Inflamm*, accepted; vol. 00(0):000-000; Received 9 December 2014; Accepted 12 February 2015 (<http://www.hindawi.com/journals/mi/aip/249205/>).
 146. Hooper PL (1999) Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341(12):924–925.
 147. Biro S, Masuda A, Kihara T, Tei C (2003) Clinical implications of thermal therapy in lifestyle-related diseases. *Exp Biol Med* 228(10):1245–1249.
 148. Beever R (2010) The effects of repeated thermal therapy on quality of life in patients with type II diabetes mellitus. *J Altern Complement Med* 16(6):677–681, PubMed PMID: 20569036.
 149. Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MH, Mesa JL et al (2008) HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(5):1739–1744.
 150. Gupte AA, Bomhoff GL, Touchberry CD, Geiger PC (2011) Acute heat treatment improves insulin-stimulated glucose uptake in aged skeletal muscle. *J Appl Physiol* 110(2):451–457, PubMed PMID: 21148343.

993
994
995
996
997
998
999

151. Gupte AA, Bomhoff GL, Swerdlow RH, Geiger PC (2009) Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Diabetes* 58(3):567–578.
152. Bathaie SZ, Jafarnejad A, Hosseinkhani S, Nakhjavani M (2010) The effect of hot-tub therapy on serum Hsp70 level and its benefit on diabetic rats: a preliminary report. *Int J Hyperthermia* 26(6):577–585.

1000