

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE – ICBS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Jorge Roberto de Matos

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E EXPRESSÃO
DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE
RATOS WISTAR MACHOS SUBMETIDOS A UMA SESSÃO AGUDA DE TERAPIA
HIPERTÉRMICA**

Porto Alegre

2020

Jorge Roberto de Matos

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E EXPRESSÃO
DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE
RATOS WISTAR MACHOS SUBMETIDOS A UMA SESSÃO AGUDA DE TERAPIA
HIPERTÉRMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Krause

Porto Alegre

2020

DEDICATÓRIA

Para minha mãe, meu pai, minha irmã e meu irmão
Para minha esposa e minha filha

AGRADECIMENTOS

Quando entrei em contato com o Professor Maurício, querendo fazer o mestrado em fisiologia, uma ideia que mantinha desde a graduação, ele me disse (talvez tentando ter certeza que eu sabia o que me esperava), que as pessoas não conseguiriam me ajudar. Obviamente não que não quisessem, mas porque estariam ocupados com suas próprias atividades... Não foi verdade, professor. Todos me ajudaram.

Agradeço ao professor Maurício. Sempre disponível para ajudar. Caso não tivesse feito todo o resto, somente o fato de ter me dado esta oportunidade já seria o suficiente para eu ser eternamente grato. Obrigado pela paciência, pelas sacadas rápidas e inteligentes, sempre divertidas.

Agradeço, imensamente ao professor Paulo Ivo. Obrigado pela oportunidade que me deste, pelo afeto com que me recebeste no seu laboratório, este grupo de trabalho é incrível em parte porque são pessoas incríveis, mas muito por causa da maneira pela qual vocês coordenam as coisas, professores.

Muito obrigado à Cinthia e à Rossana, primeiras pessoas que acompanhei no laboratório e que me ensinaram algo. Lembro que a Cinthia me falou para ler sobre boas práticas em laboratório, e a Rossana, foi a primeira pessoa que me mostrou eletroforese.

Agradeço também à Gisele e a Marcela por toda a ajuda, sempre que precisei, mas também por deixarem o ambiente um pouco mais leve, com seu bom humor.

Muitíssimo obrigado às pessoas com quem mais convivi, Helena, Carlinhos, Inesita. Helena, minha colega de mestrado, dividimos juntos o período do cadeirão, disciplinas, seminários. Foi incrível, porque eu te achava uma ótima profissional já lá atrás. Mas tu melhoraste, crescestes como pessoa e como profissional, e foi maravilhoso poder caminhar ao teu lado neste período. Obrigado por me acompanhar. Obrigado Carlinhos, minha referência inatingível em preparar e apresentar seminários. Muito obrigado por toda a ajuda, parceiro. Muitíssimo obrigado, Inesita, minha amiga! Não contente em ajudar, ficava tentando descobrir maneiras que poderia ajudar. Muito obrigado pela força que me deste e que foi necessária.

Agradeço também à Patrícia, à Sofia, ao Everton ('o cara' nas animações em powerpoint!), à Dona Ritinha, ao Bernardo e ao Lucas pelo auxílio quando precisei.

Muito obrigado a meus pais, que me deram as oportunidades que não tiveram. E queriam apenas que eu fizesse o melhor possível delas, o que tenho tentado fazer. Mônica, Mariana, obrigado pelo apoio, principalmente entendendo as ausências constantes. Sem o suporte de vocês não teria sido possível. Conseguimos juntos. Obrigado, sempre.

Concluir o mestrado não foi doloroso, foi emocionante. Estou terminando algo que foi um desejo há muito tempo, que amei fazer e que foi minha vida neste período. Dizer adeus a vocês, meus amigos, saber que não participarei das rodadas de experimentos, seminários, almoços, é emocionante. Mas sei que este é um capítulo da minha vida que acabou. Obrigado por terem feito parte dele!

RESUMO

O papel da resposta inflamatória crônica de baixo grau na patogênese de várias doenças já está bem demonstrado. Mecanismos de defesa endógenos com ação anti-inflamatória podem atenuar estes efeitos prejudiciais e são induzidos num processo dependente da expressão de uma classe de proteínas chamadas de proteínas de choque térmico (do inglês, Heat Shock Proteins, HSP), estimulado pela ativação da resposta de choque térmico (do inglês, Heat Shock Response, HSR), um mecanismo adaptativo primitivo e evolutivamente conservado que desempenha papéis fundamentais na proteostase e na defesa biológica contra diversos fatores citotóxicos. Um dos indutores desta heat shock response, o tratamento hipertérmico, é um método terapêutico que apresenta resultados benéficos na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e metabólicas por melhorar a sinalização da insulina e por seus efeitos na redução da inflamação. Diversos mecanismos foram sugeridos para explicar como a terapia hipertérmica induz estes benefícios, sendo que uma das hipóteses está relacionada à produção de Óxido Nítrico (NO), induzida pela elevação na temperatura corporal. Este é um radical livre gasoso que participa de diversos mecanismos fisiológicos, tais como o controle da vasomotricidade, sinalização celular, secreção de insulina, captação de glicose e, é claro, indução das HSPs. Considerando este eixo NO-HSP e sua relação na etiologia de doenças inflamatórias, torna-se útil sabermos como se dá a relação temporal entre a indução da heat shock response via NO, identificando melhor este mecanismo, buscando assim, uma melhor estratégia de uso da terapia térmica. Para isso, utilizamos 32 ratos Wistar machos que foram submetidos a tratamento térmico agudo e mortos em diferentes momentos. Avaliamos por imunodeteção, no tecido muscular esquelético, a expressão de HSP70 e seu fator de transcrição (HSF1) e a isoforma endotelial da enzima que catalisa a reação para formação de NO. Como era esperado, o choque térmico resultou numa expressão aumentada de HSP70 que mudou conforme o perfil de fibras do músculo avaliado. Nos mesmos tecidos também calculamos a concentração de nitritos e nitratos totais, como medidor da produção de óxido nítrico. Mostramos uma produção aumentada de NO, que também variou conforme o perfil de fibras do músculo. Nossos dados confirmaram uma resposta do óxido nítrico e das HSP70 com picos de expressão de HSP70 apresentando diferenças temporais nos músculos glicolíticos e oxidativos. No entanto, estudos complementares são necessários para melhor compreensão destes mecanismos.

Palavras chave: *Resposta de estresse térmico, Óxido Nítrico, Proteínas de estresse térmico; inflamação crônica de baixo grau.*

ABSTRACT

The role of the low-grade chronic inflammatory response in the pathogenesis of various diseases is evident. Endogenous defense mechanisms that have an anti-inflammatory action and can, therefore, mitigate these harmful effects are induced in a process dependent on the expression of a class of proteins called heat shock proteins (HSP), stimulated by the activation of the heat shock response (HSR), a primitive and evolutionarily conserved adaptive mechanism that plays fundamental roles in proteostasis and biological defense against various cytotoxic factors. One of the inducers of this heat shock response, the hyperthermic treatment, is a therapeutic method that has beneficial results in the prevention and treatment of cardiovascular and metabolic diseases by improving insulin signaling and its effects in reducing inflammation. Several mechanisms have been suggested to explain how hyperthermic therapy induces these benefits, one of which is related to the production of nitric oxide (NO), induced by the increase in body temperature. This is a gaseous free radical that participates in several physiological mechanisms, such as vasomotricity control, cell signaling, insulin secretion, glucose uptake and, of course, HSP induction.

Considering this NO-HSP axis and its relationship in the etiology of inflammatory diseases, it is useful to know how the temporal relationship between the induction of heat shock response via NO occurs, better identifying this mechanism, in a way that we can find a better usage strategy of thermal therapy. For this, we used 32 male Wistar rats that underwent acute heat treatment and were killed at different times. We evaluated by denaturing gel electrophoresis in skeletal muscle tissue, the expression of HSP70 and its transcription factor (HSF1) and the endothelial isoform of the enzyme that catalyzes the reaction to form NO. As expected, the thermal shock resulted in increased expression of HSP70 that changed according to the fiber profile of the evaluated muscle. In the same tissues, we also calculate the concentration of total nitrate/nitrite, as an indicator of nitric oxide production. We showed an increased production of NO, which also varied according to the muscle fiber profile. Our data confirmed a response of nitric oxide and HSP70 with peaks of HSP70 expression showing temporal differences in glycolytic and oxidative muscles. However, further studies are needed to better understand these mechanisms.

Keywords: *Heat stress response, nitric oxide, heat shock proteins; Low-grade inflammation.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de ativação do HSF1.....	14
Figura 2: Ação do óxido nítrico no leito vascular.....	16
Figura 3. Mecanismo proposto entre terapia térmica e ciclo NO-HSP.....	17
Figura 4: Animais utilizados no estudo.....	22
Figura 5: Delineamento experimental do estudo.....	23
Figura 6. Fotografia de animal durante a sessão de terapia hipertérmica.....	25
Figura 7. Controle da temperatura do animal.....	26
Figura 8. Conteúdo de NO_x^- total no músculo gastrocnêmio.....	33
Figura 9. Conteúdo de NO_x^- total no músculo sóleo.....	34
Figura 10. Imunodeteção de HSP70 no músculo gastrocnêmio.....	35
Figura 11. Imunodeteção de HSF1 no músculo gastrocnêmio.....	36
Figura 12. Imunodeteção de HSP70 no músculo sóleo.....	37
Figura 13. Imunodeteção de eNOS no músculo sóleo.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	Proteína quinase B
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eHSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa extracelular
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
HFD	Dieta rica em gordura
HS	Heat Shock
HSF1	Fator de Choque Térmico 1
HSP	Proteína de Choque térmico
HSP60	Proteína de Choque térmico de 60 kDa
HSP70	Proteína de Choque térmico de 70 kDa
HSP90	Proteína de Choque térmico de 90 kDa
HSPA1A	Gene codificador de HSP70 induzível
HSPA1B	Gene codificador de HSP70 induzível
iHSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa intracelular
IKK	Cinase da I κ B
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
I κ B α	Proteína inibitória kappa B alfa
JNK	c-Jun N-terminal quinases

L-NAME	Éster Metílico de L-Nitroarginina
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
NOx ⁻	Nitrito + nitrato
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PFK	Fosfofrutoquinase
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fluoreto de fenil-metil-sulfonila
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio
SIRT1	Proteína Sirtuína 1
TEN	Tris-EDTA-NaCl
TLR	Receptores do tipo Toll

SUMÁRIO

1 Introdução	10
2 Objetivos	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3 Métodos.....	21
3.1 Locais de Execução do Projeto.....	21
3.2 Aspectos Éticos.....	21
3.3 Animais	21
3.4 Cálculo do Tamanho Amostral	22
3.5 Desenho experimental	23
3.6 Grupos Experimentais.....	24
3.7 Sessão de terapia hipertérmica.....	24
3.8 Morte dos animais.....	27
3.9 Obtenção e processamento de tecido muscular (gastrocnêmio e sóleo).....	27
3.10 Cálculo das concentrações de proteínas	28
3.11 Dosagens de Nitratos e Nitritos.....	28
3.12 Expressões Proteicas por Imunodeteccção em Gastrocnêmios e Sóleos.....	29
3.13 Análise Estatística.....	31
4 Resultados	32
4.1 Conteúdo de NO_x^- total no músculo gastrocnêmio:.....	32
4.2 Conteúdo de NO_x^- total no músculo sóleo:.....	33
4.3 Expressão de HSP70 no músculo gastrocnêmio:	34
4.4 Expressão de HSF1 no músculo gastrocnêmio:	35
4.5 Expressão de HSP70 no músculo sóleo:	36
4.6 Expressão de eNOS no músculo sóleo:.....	37
5 Discussão.....	39
6 Conclusões e perspectivas.....	45
Referências	46

1 INTRODUÇÃO

Na maioria das vezes, quando confrontados com a palavra inflamação, nos vem à mente uma resposta a uma infecção. O que não está equivocado, no entanto, a clássica definição de inflamação composta de rubor, calor, edema e dor, como descrito por Celsus, e perda de função, adicionado por Galeno (Netea, Mihai G., et al., 2017), já não abrange a complexidade desta resposta de proteção do organismo (Medzhitov, Ruslan, 2010).

A clássica resposta é a que ocorre sob estímulo de um agente exógeno ou mesmo endógeno. Patógenos como um vírus, fungos, bactérias ou sinais de alarme endógenos (alarminas), podem desencadear esta ação protetiva. (Schett, Georg; Neurath, Markus F., 2018).

Contudo, nas últimas décadas, muitos estudos têm tido como foco uma manifestação particular da inflamação, a inflamação crônica de baixo grau, sendo essa definida como uma elevação de duas a quatro vezes nos níveis circulantes de citocinas inflamatórias e proteínas da fase aguda, bem como elevações menores na contagem de neutrófilos e natural killer cells (Woods, Jeffrey A.; Vieira, Victoria J.; Keylock, K. Todd, 2009; Furman, David, et al., 2019; Tilg, Herbert, et al., 2019).

Acontece que a resposta inflamatória aguda, quando completa, envolve sua resolução. Ao mesmo tempo em que há a liberação de fatores pró-inflamatórios também são secretados mensageiros químicos anti-inflamatórios que atuarão no sentido de cessar esta resposta assim que a homeostasia esteja restabelecida. No entanto, sob algumas condições, como por exemplo na presença de obesidade, esta inflamação pode não se resolver por completo levando à cronificação deste processo inflamatório (Miragem, Antônio Azambuja; Bittencourt, Paulo Ivo Homem de, 2017; Nathan, Carl; Ding, Aihao, 2010).

Já sabemos que esta inflamação de baixo grau está relacionada com diversas doenças crônico-degenerativas. Diabetes mellitus tipo II, mal de Alzheimer, acidente vascular cerebral são apenas alguns exemplos desta relação (Newsholme, Philip; Krause, Mauricio, 2014). Por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa, uma citocina pró-inflamatória que ativa várias cascatas de transdução de sinal que são inibidoras críticas da ação da insulina, está superexpressa no tecido adiposo de animais obesos (Hotamisligil, Gökhan S., 2006).

Considerando, então, que estas doenças apresentam ao menos em parte uma etiologia inflamatória, é sensato razoar que estratégias atenuadoras desta inflamação diminuam os efeitos deletérios nestas situações (Krause, Mauricio, et al., 2015a). Uma destas estratégias é a terapia por calor, pelas razões expostas a seguir. Vários estudos têm mostrado os efeitos benéficos para indivíduos com doenças metabólicas e cardiovasculares (Krause, Mauricio, et al., 2015b; Bruxel, Maciel Alencar, et al., 2019; Hooper, Philip L., et al., 2014). O primeiro estudo que testou os efeitos da terapia de calor em indivíduos diabéticos (tipo 2) foi publicado em 1999 (Hooper, Philip L., 1999). Nesse estudo, os pesquisadores recrutaram, testaram e submeteram oito pessoas a 30 min de tratamento térmico (imersão até o pescoço, temperatura da água variando entre 38-41 °C), seis vezes por semana, durante três semanas. Os resultados demonstraram que a terapia por calor resultou em melhoras metabólicas bastante consideráveis: redução do peso corporal, redução da utilização de drogas antidiabéticas, diminuição da glicemia e da hemoglobina glicada, entre outros. Estes resultados indicaram que o uso desse tipo de intervenção pode ser eficaz no combate à obesidade e diabetes.

A terapia por calor se apresenta como um simulacro de uma complexa resposta fisiológica cuja principal característica é uma redefinição temporária do ponto de ajuste termostático do corpo, resultando em um aumento da temperatura central – a febre. A indução da febre, em humanos, requer um aumento de seis vezes na taxa metabólica e manter uma temperatura central em níveis febris exige em torno de 12% de aumento na taxa metabólica por grau (Celsius) acrescido na temperatura central (Singh, Ishwar S.; Hasday, Jeffrey D., 2013). Sendo um persistente traço evolucionário, inclusive em animais poiquilotérmicos, seus benefícios devem contrabalançar os custos a um hospedeiro infectado.

O aumento na temperatura corporal atuará modificando respostas biológicas, regulando vias sinalizatórias, incluindo expressão gênica, estimulando a resposta de choque térmico (*heat shock response* – HSR).

A HSR faz parte de uma complexa resposta que visa manter a homeostasia de componentes celulares, como transcissoma, proteoma, metaboloma e sinalização intercelular em metazoários (Asea, Alexzander A. A.; Kaur, Punit, 2018), altamente conservada e que é essencial para a sobrevivência ante uma infinidade de estresses ambientais, incluindo estresse térmico, estresse oxidativo, produtos químicos e radiações e ainda em várias doenças que causem um desbalanço na proteostase

celular, cada um dos quais pode causar desnaturação de proteínas celulares essenciais (Krause, Maurício S., et al., 2007). Também definida como “resposta ao estresse celular”, a HSR é acompanhada de reprogramação do mecanismo de transcrição e tradução celular para expressão preferencial de um conjunto de proteínas induzíveis por esses estressores – as proteínas de choque térmico (HSPs) (Asea et al., 2018, Singh, Ishwar S.; Hasday, Jeffrey D., 2013).

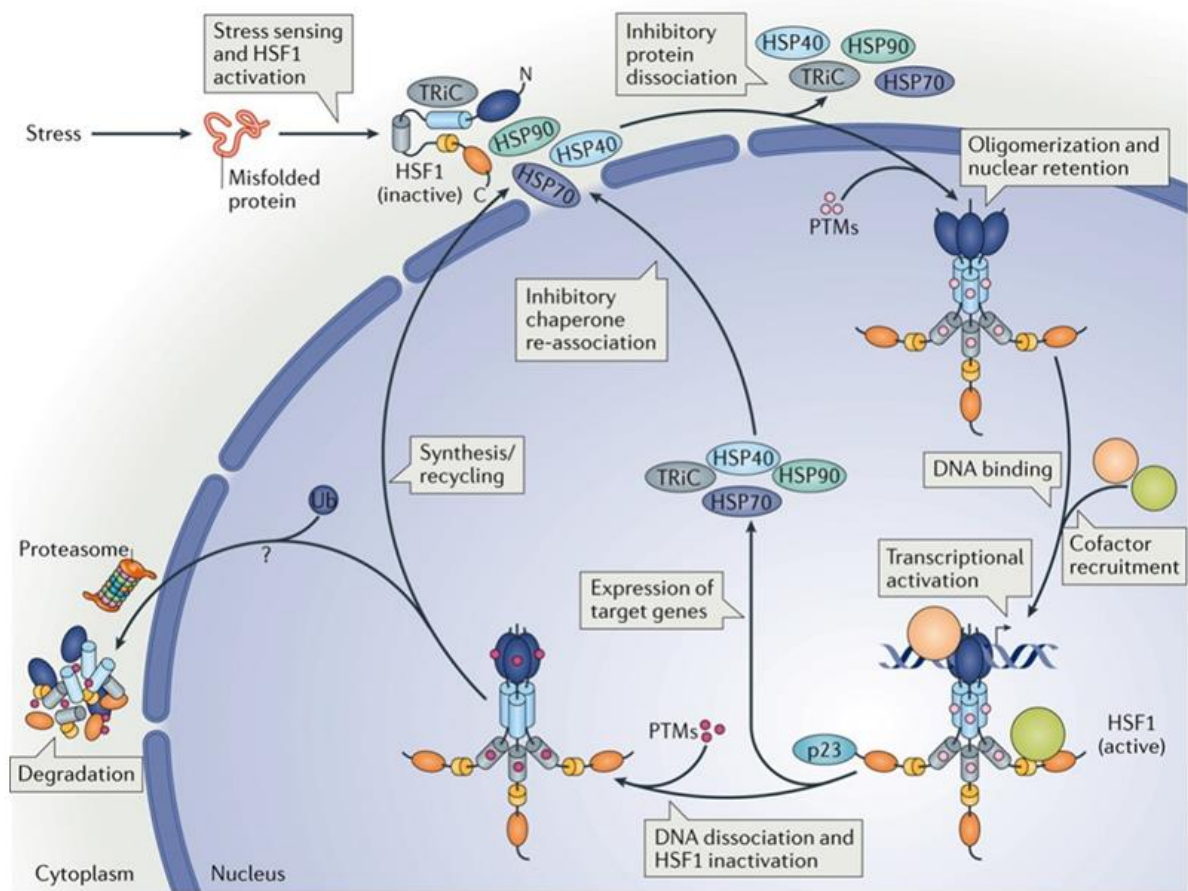
Estas HSPs fazem parte de uma família de proteínas conhecidas como proteínas de estresse e fazendo parte da HSR, são induzidas pelos fatores acima citados e ainda outros (Krause, Mauricio, et al., 2015b). São comumente classificadas conforme suas massas moleculares em famílias, as HSP20, HSP40, HSP60, HSP70 (sendo a mais estudada), HSP90 e HSP110. Estão presentes no citoplasma, nas mitocôndrias, retículo endoplasmático e núcleos, embora varie a proteína presente (Kregel, Kevin C., 2002; Kampinga, Harm H., et al., 2009). Na sua maioria, as proteínas de choque térmico são expressas constitutivamente de modo fisiológico em células, funcionando como chaperonas moleculares, guiando polipeptídeos recém-formados pelos estágios de enovelamento e desenovelamento até a proteína atingir a maturação e configuração funcional correta. As HSPs também estão envolvidas no transporte de proteínas pela membrana celular e no reparo de proteínas desnaturadas (Mehta, Tapan A., et al., 2005). Da mesma forma, desempenham um papel na homeostase celular numa variedade de condições clinicamente relevantes, incluindo o câncer, as respostas imunes, infecções, diabetes, obesidade e resistência à insulina (Anckar, Julius; Sistonen, Lea, 2011; Krause, Mauricio, et al., 2015b; Muller, Carlos H. de L., et al., 2019). De fato, uma reduzida expressão das proteínas de estresse térmico de 70 kDa (HSP70), é uma característica comum no envelhecimento, diabetes mellitus tipo 2 e obesidade, situações associadas à inflamação crônica de baixo grau (Krause, Mauricio, et al., 2015b).

Acreditava-se que as HSPs fossem exclusivamente proteínas citoplasmáticas, com funções restritas ao compartimento intracelular. No entanto, um número crescente de observações indicou que elas podem ser liberadas para o espaço extracelular (eHSP70) com uma grande variedade de efeitos em outras células. E, de modo geral, a HSP70 intra e extracelular têm funções diferentes. Enquanto a iHSP70 confere proteção celular em situações de estresse, a eHSP70 parece ter um papel sistêmico na apresentação de antígeno e imunidade (Krause, Mauricio, et al., 2015b),

apresentando uma ação pró-inflamatória, mediada por MyD88 / IRAK / NF- κ B e ligação através dos receptores tipo Toll 2 e 4 (Asea et al, 2002).

Nos eucariotos, a expressão de HSP é regulada em nível transcricional pelo fator de transcrição de proteínas do choque térmico - HSF (heat shock factor). Mamíferos possuem três ortólogos HSF, dos quais o HSF1 é o ortólogo induzível pelo calor (Singh, Ishwar S.; Hasday, Jeffrey D., 2013).

De modo breve, o ciclo de ativação do fator de transcrição de proteínas do choque térmico-1 funciona da seguinte maneira. Em resposta a condições de estresse proteotóxico, o HSF1 fica sujeito a um ciclo de ativação e atenuação de várias etapas. Os monômeros HSF1 inativos ficam retidos no citoplasma complexados com proteínas reguladoras, como as proteínas de choque térmico (HSPs) 40, 70 e 90, bem como o complexo citossólico da chaperonina TCP1 (TRiC). Diante de uma situação de estresse, o HSF1 é ativado, causando sua dissociação das proteínas inibitórias, oligomerização do HSF1 e retenção nuclear. O HSF1 sofre várias modificações pós-traducionais de ativação (MPTs) que promovem a ligação ao DNA e a ativação transcricional dos genes alvo em conjunto com o recrutamento de cofatores. O HSF1 é então modificado por diferentes MPTs inibitórias e pela co-chaperona p23, causando dissociação do DNA, inativação do HSF1 e sua degradação. Finalmente, após a atenuação, o HSF1 é mantido no citoplasma por um complexo proteico inibitório em um mecanismo de feedback negativo (Gomez-Pastor, Rocio; Burchfiel, Eileen T.; Thiele, Dennis J., 2018. (Figura 1).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1: Ciclo de ativação do HSF1, num primeiro momento inativo, translocação ao núcleo e consequente expressão de proteínas-alvo. Fonte: Gomez-Pastor, Rocio; Burchfiel, Eileen T.; Thiele, Dennis J., 2018.

Como dissemos, a indução artificial desta resposta por meio da terapia térmica – aumento na temperatura corporal em valores similares aos da febre – tem sido utilizada com objetivos terapêuticos (Krause, 2015a), uma vez que numerosos estudos têm mostrado um prejuízo nesta resposta durante a presença de inflamação crônica. (Newsholme, Philip; Bittencourt Jr., Paulo I. Homem de, 2014; Palmer et al, 2015; Schafer, Marissa J., et al., 2017)

Durante este aumento na temperatura corporal há um aumento na atividade nervosa simpática para ajustar a resposta cardiovascular e termorregulatória e há fortes evidências de que o sistema do óxido nítrico esteja envolvido nesta vasodilatação (Krause, Mauricio, et al., 2015a).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso ($\cdot\text{N}=\text{O}$) e uma molécula sinalizadora gerada a partir da arginina pela ação de uma de três NO sintases (NOS)

(Harkins, Michelle S., 2009), e que participa de praticamente todas as funções celulares e orgânicas no corpo, por exemplo, regulação do relaxamento e proliferação de células do tecido muscular liso vascular, adesão leucocitária, agregação plaquetária, angiogênese e trombose. Atua também como neurotransmissor, no caso de neurônios e é mediador da resposta imune quando liberado por macrófagos ativados (Newsholme et. al., 2010; Krause, Mauricio, et al., 2015a).

De especial interesse em nosso trabalho é a sua ação no leito vascular. Que, de modo sucinto, acontece da seguinte maneira: sob condições fisiológicas, a liberação de óxido nítrico no lúmen do vaso pela isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) nas células endoteliais inibe a agregação plaquetária e a trombose. Abluminalmente, o NO de maneira parácrina ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC) para produzir cGMP e ativar a proteína cinase G (PKG) nas células do músculo liso (SMCs). O cGMP e a PKG contribuem para diminuir os níveis intracelulares de Ca^{2+} , estimulando sua recaptção pela ATPase de cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático / endoplasmático (SERCA) e sua extrusão através da ATPase de transporte de cálcio da membrana plasmática (PMCA). Além disso, a PKG desencadeia o efluxo de K^+ pelo canal de potássio sensível a Ca^{2+} de alta condutância (BKCa) para hiperpolarizar a célula, reduzindo assim a entrada de Ca^{2+} através do canal de cálcio do tipo L (LTCC). Finalmente, a PKG promove a desfosforilação da cadeia leve da miosina através da fosfatase associada (MLCP). Juntas, essas modificações mediam a vasodilatação. O tecido adiposo perivascular (PVAT) contribui para esse efeito em condições saudáveis, liberando NO e adiponectina (APN), que ativa a produção de NO nas SMCs (Figura 2).

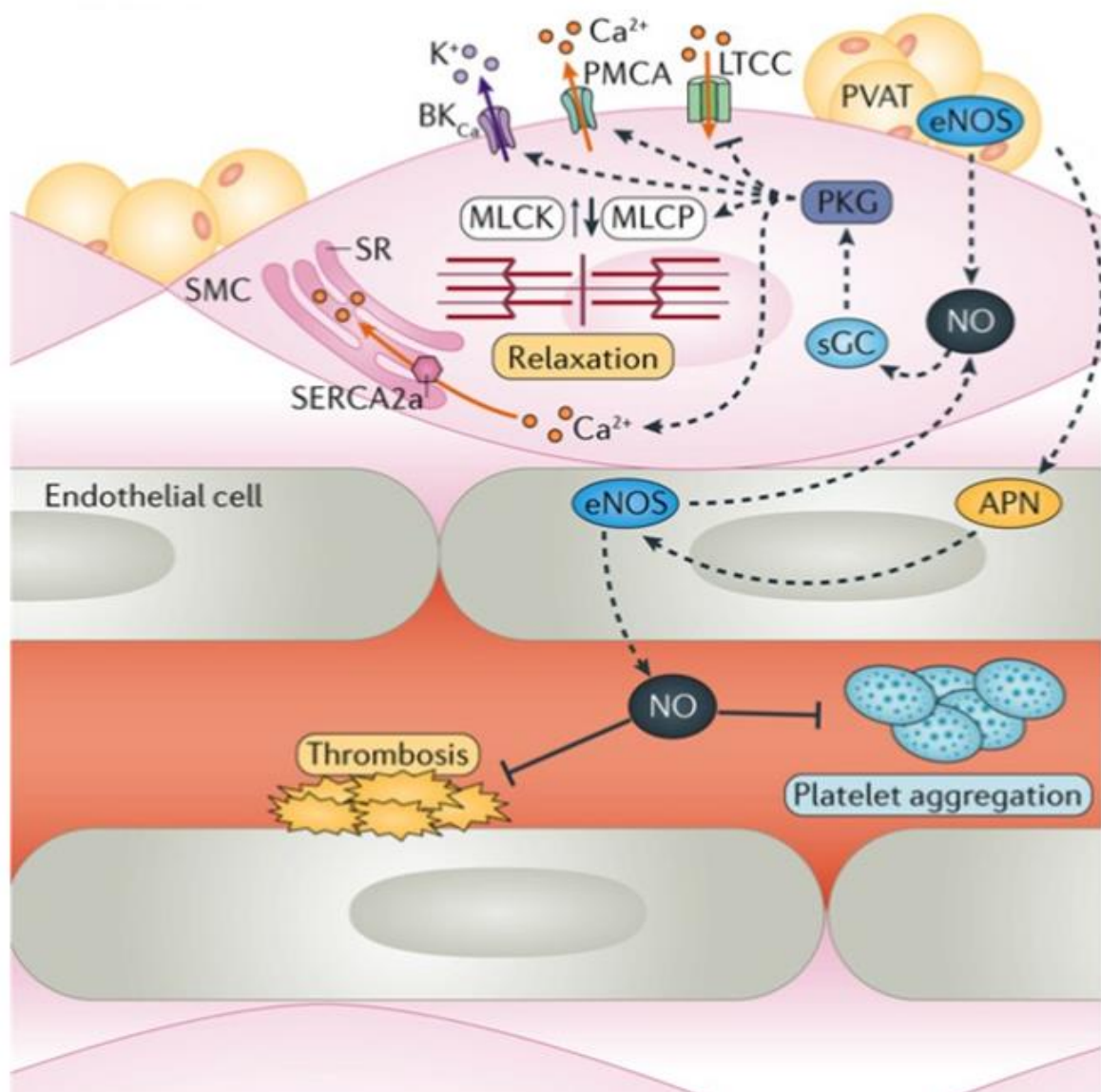


Figura 2: Ação do óxido nítrico no leito vascular. Fonte: Farah, Charlotte; Michel, Lauriane YM; Balligand, Jean-Luc, 2018.

Além disso, o NO é também um potente ativador da expressão de HSP70 (Miragem, Antônio Azambuja; Bittencourt, Paulo Ivo Homem de., 2017; Krause, Mauricio, et al., 2015a), e talvez, seja esta uma das vias pelas quais a terapia térmica exerça seus benefícios para pessoas obesas e diabéticas (Krause, Mauricio, et al., 2015a). Apesar de já termos diversos destes benefícios atribuídos à terapia de calor (Krause, Mauricio, et al., 2015b), os mecanismos exatos pelos quais estes efeitos são conseguidos ainda não estão completamente esclarecidos. Alguns estudos demonstraram que a expressão de HSP70, que aparentemente é a principal modificação no *hot tub* (banheira de imersão em água quente), depende muito da produção prévia de NO (Malyshev, IYu, et al., 2000). A inibição prévia da NOS, antes

do choque térmico, em ratos, mostrou limitar a resposta vasodilatadora frente ao aquecimento corporal. A administração de inibidores inespecíficos de NOS via microdiálise ou via infusão, pela artéria braquial, limitou não só a resposta vasodilatadora reflexa ao aquecimento corporal, mas também reduziu a síntese de HSP70 induzida por terapia de calor, sugerindo que o NO está envolvido nessa indução. O efeito anti-hipotensivo da adaptação ao calor demonstra claramente o cross-talk entre o óxido nítrico e HSP70 (Malyshev, IYu, et al., 2000).

Em um trabalho de nosso grupo de pesquisa sugerimos que a via de sinalização ativada no tratamento de choque térmico, possa ser mediada pelo aumento transitório na produção de NO, seguida por aumentos na expressão de HSP70, conforme figura 3 (Krause, Mauricio, et al., 2015a).

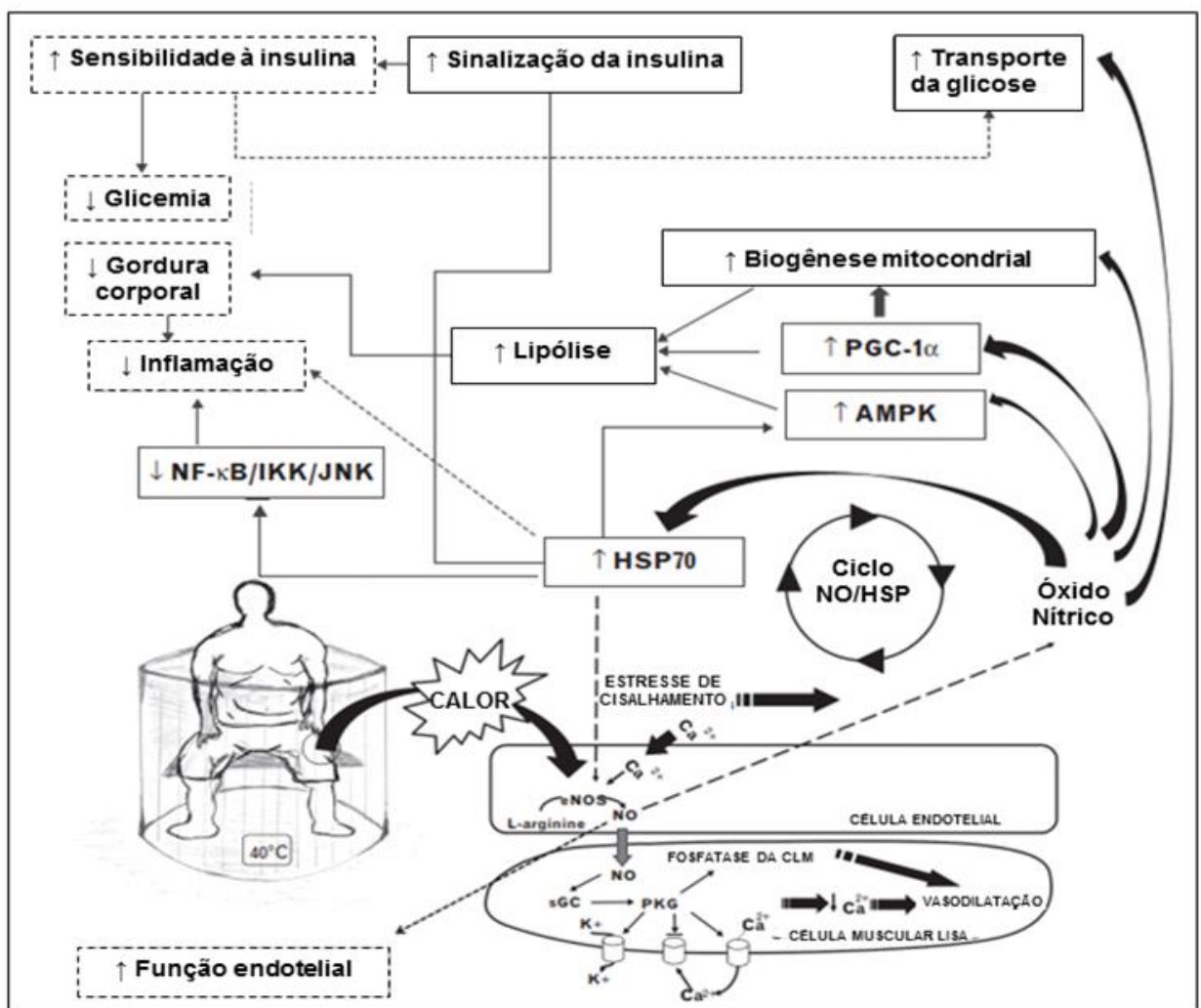


Figura 3. Mecanismo proposto entre terapia térmica e ciclo NO-HSP (para descrição ver o texto). eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; HSP, proteína de choque térmico; IKK, inibidor da quinase kB; JNK, c-Jun NH2-quinase terminal; NF-κB, fator de transcrição nuclear kB; NO, óxido nítrico. Fonte: adaptado de Krause, Mauricio, et al., 2015a.

A maior parte dos estudos explicando estes mecanismos foi realizada em animais. Nesses, muitos dos benefícios decorrentes são resultado do aumento na expressão das HSPs. As HSPs terão efeitos positivos, seja protegendo contra hiperglicemia induzida pela obesidade, diminuindo a intolerância à glicose ou mesmo exercendo ação anti-inflamatória, impedindo que o inibidor do NF- κ B, o I κ B se dissocie deste, o que permitiria sua translocação ao núcleo e consequente síntese de citocinas inflamatórias.

No entanto, o aumento na temperatura corporal elicitado pelo tratamento térmico em animais é da ordem de aproximadamente 5 °C (~36,5 °C - 41,42 °C), enquanto que em humanos a temperatura é elevada até 1,2 °C. (Krause, Mauricio, et al., 2015a).

Com humanos, não sabemos se esta elevação na temperatura desencadearia uma maior expressão de proteínas de estresse térmico.

Considerando isto, num primeiro momento, mecanismos mais sensíveis podem estar envolvidos nas respostas positivas do tratamento térmico, vias que atuarão através de aumentos prévios no NO em relação às HSPs (Krause, Mauricio, et al., 2015a).

Assim, como os efeitos cardiovasculares da sauna e da banheira de hidromassagem (*hot tub*) iniciam-se rapidamente após o aquecimento inicial da pele, os aumentos de NO durante a sessão de tratamento térmico podem iniciar as adaptações do paciente ao aumento da temperatura. Acreditamos que as elevações transitórias crônicas do NO iniciam um ciclo que induz uma maior expressão de HSP70 (ciclo NO-HSP70). À medida que o tratamento térmico progride, os níveis elevados de HSP70 (decorrentes da sessão anterior) aumentam, por fim, a fosforilação de p-AKT, p-AMPK e p-eNOS. Como resultado, mais NO será produzido, melhorando a vasomotricidade e a vasoproteção durante a resistência à insulina e diabetes, por exemplo. Incrementos na atividade e expressão da AMPK e do receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa-1 (PGC-1 α , que aumenta a biogênese mitocondrial), também ajudam a explicar as reduções no gasto energético, gordura corporal e peso corporal encontradas após o tratamento térmico. Além disso, a elevação dos níveis de HSP70 vai estimular a inibição e/ou redução da sinalização inflamatória de moléculas como NF- κ B, IKK e JNK, todas diminuídas pelo choque térmico. A redução da adiposidade também pode levar a uma redução da inflamação de baixo grau. Juntos, níveis mais altos (ou normalizados) de NO, HSP70, AMPK e

eNOS melhorariam a sinalização e a sensibilidade à insulina, composição corporal, gordura corporal, disfunção endotelial e a inflamação crônica de baixo grau.

Por fim, a terapia de calor mostra-se, portanto, uma ferramenta promissora e de baixo custo para a redução da inflamação crônica de baixo grau, que pode ser perfeitamente incluída na prevenção e tratamento de indivíduos obesos e diabéticos.

Dessa forma propusemos que os incrementos transitórios nos níveis de NO e HSP70 possam explicar os benefícios da terapia de calor. E com o objetivo de demonstrar melhor estes mecanismos, permitindo que se estabeleça uma estratégia terapêutica mais favorável no uso deste tratamento, idealizamos este trabalho.

Nosso principal objetivo foi verificar quando se dá o ponto de maior expressão das proteínas de estresse térmico sob indução do NO. Esta relação temporal ainda não está estabelecida e é nosso principal intuito.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a evolução temporal da produção de óxido nítrico, em decorrência de estresse térmico agudo, e da expressão de HSP70 em ratos Wistar machos, identificando seu ponto de maior expressão.

2.2 Objetivos Específicos

- Submeter os animais a uma sessão aguda de terapia hipertérmica;
- Verificar a expressão de HSP70, HSF1, eNOS, nNOS no músculo esquelético com predominância de fibras glicolíticas (gastrocnêmio) nos momentos 1, 2, 4 e 8 h pós-sessão de terapia hipertérmica;
- Verificar a expressão de HSP70, HSF1, eNOS, nNOS no músculo esquelético com predominância de fibras oxidativas (sóleo) nos momentos 1, 2, 4 e 8 h pós-sessão de terapia hipertérmica;
- Verificar a produção de nitritos e nitratos (tNO_x^-) no músculo esquelético com predominância de fibras glicolíticas (gastrocnêmio) nos momentos 1, 2, 4 e 8 h pós-sessão de terapia hipertérmica;
- Verificar a produção de nitritos e nitratos (tNO_x^-) no músculo esquelético com predominância de fibras oxidativas (sóleo) nos momentos 1, 2, 4 e 8 h pós-sessão de terapia hipertérmica;

3 MÉTODOS

3.1 Locais de Execução do Projeto

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Inflamação, Metabolismo e Exercício (LAPIMEX) e Laboratório de Fisiologia Celular (FisCel), do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Localizado no campus central da UFRGS.

3.2 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Pesquisa e Ética desta universidade, e estiveram em comprometimento com a perturbação mínima do bem-estar dos animais submetidos ao protocolo experimental, conforme a Lei Arouca nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (número 32787).

3.3 Animais

Foram utilizados 32 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) entre 3 - 4 meses de idade, com peso corporal entre 250 e 300 g, fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e mantidos durante a experimentação neste mesmo local.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (33 x 17 x 40 cm), (4 animais por caixa), sob iluminação com ciclo de claro/escuro de 12 h, temperatura de 26 ± 2 °C, umidade relativa do ar entre 50 e 60% (Figura 4). Foram alimentados com dieta comercial padrão para animais de laboratório contendo aproximadamente 52 % de carboidratos, 21 % de proteínas e 4 % de lipídios e receberam água e ração ad libitum. Os procedimentos experimentais seguiram as normas éticas brasileiras (Goldim, José Roberto; Raymundo, Márcia Mocellin, 2003), as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais (Hoff, Christina, 1980) e do Código

Brasileiro de Experimentação Animal - 1988, em conformidade com o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório do National Institutes of Health (Albus, Udo, 2012). Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Utilização de Animais da UFRGS do Comitê de Ética em Pesquisa desta Universidade.



Figura 4: Animais utilizados no estudo. Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*). Fonte: Grigollo, G. B.

3.4 Cálculo do Tamanho Amostral

O número de animais utilizados na execução do projeto foi o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento. Nesse contexto, o tamanho da amostra foi calculado para detectar a menor diferença esperada entre os grupos (de acordo com a literatura para a principal variável crítica do estudo, a expressão de HSP70 (Malyshev, IYu, et al., 2000). Considerados esses parâmetros o número estimado de animais por grupo foi de oito. Desta forma, utilizamos no protocolo 4 grupos experimentais (conforme os

tempos apresentados no item Desenho experimental - Figura 5), com 8 animais cada, perfazendo um total de 32 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*). Para o cálculo utilizamos um poder estatístico de 80% para um nível de significância de $P < 0,05$ e o software foi o GPower versão 3.1.

3.5 Desenho experimental

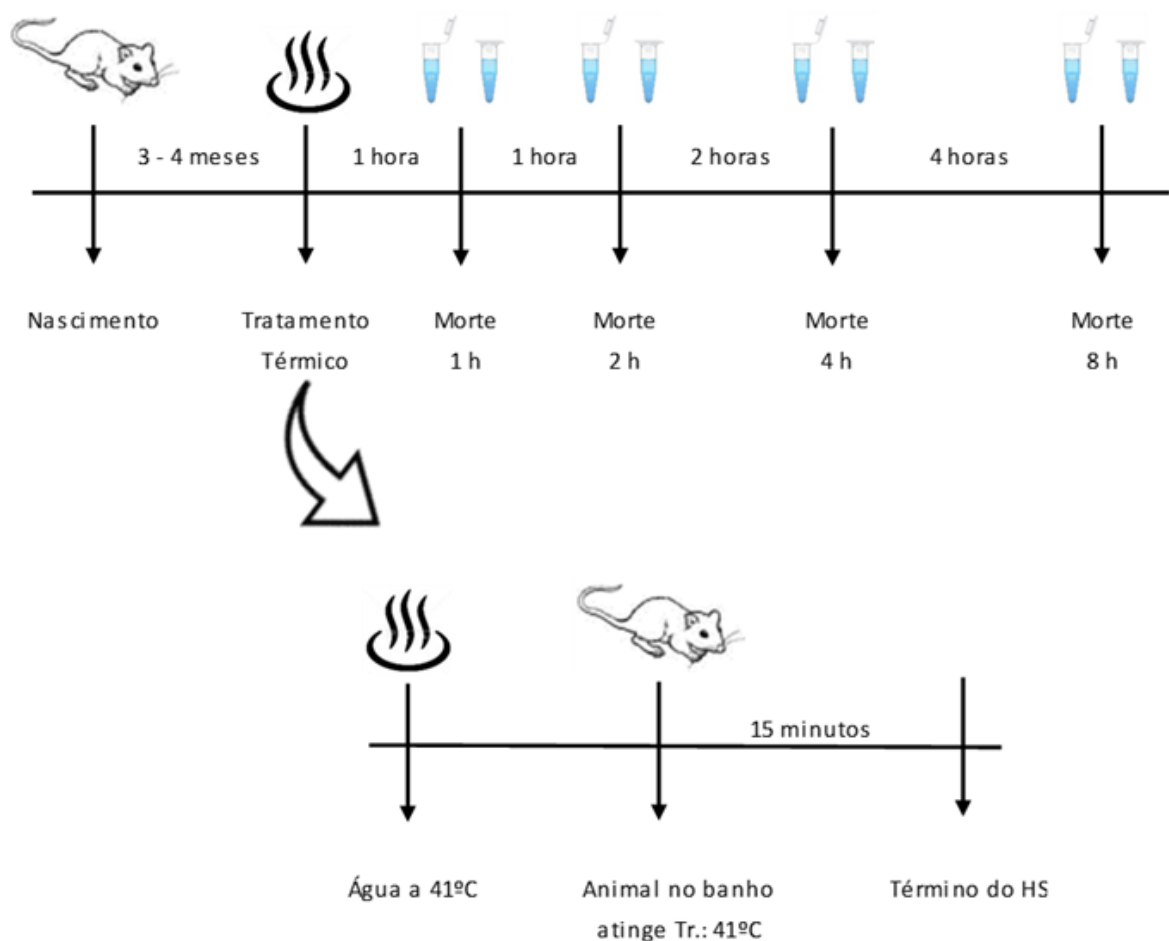


Figura 5: Delineamento experimental do estudo. Tínhamos 4 grupos experimentais com diferentes tempos de morte após o tratamento hipertérmico. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 Grupos Experimentais

Como nosso objetivo era verificar quando se dava o pico de liberação de HSP70 pós-choque térmico, os animais foram aleatoriamente separados em 4 grupos, correspondentes ao momento da morte pós-sessão de terapia hipertérmica. Tínhamos, então, o grupo de animais de 1 hora, 2, 4 e 8 h pós-choque.

3.7 Sessão de terapia hipertérmica

Para a sessão de terapia hipertérmica, os animais foram anestesiados (tiopental sódico, 40 mg / kg, i.p.), e 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. Eles ficavam suspensos, via fixação na borda do tanque, pela utilização de suspensório de elástico, com as patas traseiras e cauda imersas na água, uma vez que especialmente a cauda determina a regulação da temperatura perdendo calor na troca de temperatura com o ambiente (Figura 6). A temperatura da água foi mantida constante para que a resposta térmica corporal do animal permanecesse entre 41,0 °C e 41,7 °C. O controle da temperatura dos animais foi monitorado com termômetro retal (Figura 7). Quando o animal alcançava a temperatura de 41 °C, iniciava-se a contagem dos 15 min do protocolo experimental. O procedimento utilizado é um modelo adaptado e padronizado em nosso laboratório, similar a Chung, Jason, et al., 2008.



Figura 6. Fotografia de animal durante a sessão de terapia hipertérmica. Note que a cauda do animal ficava submersa. Fonte: Rodrigues, M.I.L.



Figura 7. Controle da temperatura do animal durante a sessão de terapia hipertérmica com termômetro retal. Fonte: Grigollo, G. B.

3.8 Morte dos animais

Os animais foram mortos por decapitação. Este método é extremamente rápido e eficaz, levando a perda imediata do reflexo palpebral, além de produzir mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos (Andersen, Monica Levy, et al., 2004). Nenhum anestésico ou outra substância foi administrada nos animais para a decapitação pois os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores (Brown, Eric T., et al., 2005; Saha, Joy K., et al., 2005). Sendo que estas alterações glicêmicas interferem no principal parâmetro medido, a HSP70 (Chung, Jason, et al., 2008).

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

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

3.9 Obtenção e processamento de tecido muscular (gastrocnêmio e sóleo)

Os animais, após a sessão de terapia hipertérmica foram mortos por decapitação conforme os tempos no desenho experimental. Procedeu-se à dissecação dos tecidos da seguinte maneira: eles eram fixados em uma mesa de parafina, fazíamos uma incisão longitudinal na face posterior da pata traseira do animal, iniciando próximo ao calcanhar. A incisão seguia no sentido caudal-rostral o suficiente para expor o músculo gastrocnêmio. A seguir os tendões deste músculo e do sóleo foram seccionados próximos a suas inserções no túber calcâneo e os dois músculos suspensos pelo tendão. Procedeu-se à retirada do sóleo através da secção

do seu tendão proximal, próximo a sua inserção na cabeça da fíbula. O músculo era imediatamente congelado com Nitrogênio Líquido. Na sequência procedíamos com a retirada do gastrocnêmio. As duas porções, lateral e medial, eram separadas de suas inserções nos epicôndilos lateral e medial do fêmur por uma secção próximo a estas. Os músculos eram armazenados em freezer - 80 °C para posterior processamento.

Outros tecidos também foram cuidadosamente removidos e congelados para posterior análise (não incluídos na presente dissertação): fígado, tecido adiposo, coração, encéfalo, pulmões, rins e intestino delgado.

3.10 Cálculo das concentrações de proteínas

A quantificação da concentração de proteínas em nossas amostras foi feita por meio de detecção colorimétrica, utilizando o ensaio do Ácido Bicinconínico - BCA (Smith, Paul K. et al., 1985). Este método combina a redução do Cu^{2+} a Cu^{1+} por proteína em meio alcalino (reação de biureto) com a detecção colorimétrica do cátion cuproso (Cu^{1+}) usando um reagente contendo ácido bicinconínico.

O produto da reação de cor púrpura deste ensaio é formado pela quelação de duas moléculas de BCA com um íon cuproso. Este complexo solúvel em água exibe uma forte absorvância a 562 nm que é quase linear com o aumento das concentrações de proteínas em uma ampla faixa de trabalho (20-2000 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Como curva padrão utilizamos albumina bovina.

3.11 Dosagens de Nitratos e Nitritos

Para determinação de nitritos e nitratos totais nas amostras, parte dos tecidos musculares esqueléticos previamente extraídos, congelados com auxílio de freeze-clamp em nitrogênio, foram homogeneizados em homogeneizador de facas (mantidos em gelo), em solução de PBS pH 7,4 (5 ml / g de tecido), cloridrato de N-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona (TLCK) 20 $\mu\text{mol/l}$, Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila (PMSF) 100 $\mu\text{mol/l}$, leupeptina 2 $\mu\text{g/ml}$, aprotinina 2 $\mu\text{g/ml}$, ortovanadato de sódio 1 mmol/l , molibdato de sódio 1 mmol/l e β glicerofosfato 1 mmol/l e centrifugados a 10.000 x g,

durante 20 minutos à 4 °C. Na sequência, os sobrenadantes foram ultrafiltrados em filtros de cut-off de 10 kDa (Millipore) a 12.000 x g por 60 min a 4 °C.

Concluída esta parte, utilizamos os sobrenadantes para determinação dos níveis de nitratos e nitritos totais nos tecidos analisados. Esta foi estimada indiretamente através da produção de nitritos (García-Robledo, Emilio; Corzo, Alfonso; Papaspyrou, Sokratis., 2014), e determinado com a utilização do reagente de Griess (sulfanilamida e naftiletilenodiamina), específico para NO₂. Em seguida procedeu-se leitura a 540 nm. A concentração de nitritos foi determinada com base na realização de curvas-padrão (Grisham, Matthew B.; Johnson, Glenda G.; Lancaster Jr., Jack R., 1996). A quantidade de nitrito, após a dosagem, foi calculada em termos de nmol/g de tecido.

3.12 Expressões Proteicas por Imunodeteccção em Gastrocnêmios e Sóleos

Para determinação da expressão de proteínas por Western Blotting, parte dos tecidos musculares esqueléticos previamente extraídos, congelados com auxílio de freeze-clamp em nitrogênio, foram homogeneizados em homogeneizador de facas (mantidas em gelo), em solução de SDS 0,1% cloridrato de N-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona (TLCK) 20 µmol/L, Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila (PMSF) 100 µmol/L, leupeptina 2 µg/mL, aprotinina 2 µg/mL, ortovanadato de sódio 1 mmol/L, molibdato de sódio 1 mmol/L e β-glicerofosfato 1 mmol/L .

Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 12.000 x g por 5 min à temperatura ambiente e o sobrenadante, coletado. A concentração de proteína foi determinada por Kit BCA (Thermo). As amostras foram, então, diluídas em 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 min para desnaturação completa das proteínas. Quantidades iguais de proteína (~30 µg por poço) foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10 %, para separação durante 2,5 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 de corrida contendo Tris a 25 mM e SDS a 1 % (m/v), pH 8,3.

Foi utilizada como marcador de peso molecular mistura (5 µL) de proteínas recombinantes pré-coloridas (RPN800E, GE Health Care) por gel.

Para a realização do procedimento de eletrotransferência, onde ocorre a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (GE Health Care-Amersham), foi utilizado o sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100V constantes por 2:30 horas. A confirmação do sucesso dos procedimentos descritos acima foi confirmada pela coloração da membrana de nitrocelulose com Vermelho Ponceau S (Red Ponceau S, sal de sódio 0,3 %, Sigma, em solução de ácido tricloroacético a 3%) e em seguida descoradas com solução TEN (Tris-EDTA-NaCl a respectivamente 50, 5 e 150 mM) –Tween 0,1 % (v/v). As imagens obtidas com Vermelho Ponceau S foram empregadas na normalização da quantidade de proteínas carregadas em cada poço do gel.

Na sequência, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários para HSP70 (Sigma H5147, produzido em camundongo, em diluição 1:1000), HSF1 (Sigma AV36895, produzido em coelho, 1:500), eNOS (Santa Cruz SC-654, produzido em coelho, 1:200) e nNOS (Santa Cruz SC-8309, produzido em coelho, 1:500). Lavamos as membranas 3 x por 10 min com tampão TBS-T. Em seguida, incubamos com os anticorpos secundários correspondentes, a saber, para HSP: Anti-HSP70 produzido em camundongo (SIGMA, B7401, 1:10000). Para as proteínas restantes: anticorpos produzidos em coelho (SIGMA, B8895, 1:10000), por 1 h em temperatura ambiente. Na sequência, as membranas foram novamente lavadas. Incubamos, então, durante 1 hora com Estreptavidina (SIGMA, S2438, 1:1000) e novamente procedemos as 3 lavagens como anteriormente.

Concluída esta etapa, as membranas foram tratadas com os reagentes quimiluminescentes ácido p-coumárico (2 nmol) e luminol (0,01 nmol), na presença de peróxido de hidrogênio e reveladas no equipamento (IBRIGHT C1000-Invitrogen). As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria óptica pelo uso do programa ImageJ (Frederich, Maryland, EUA), e os dados foram apresentados como unidades arbitrárias da razão obtida entre o volume de pixels de cada banda de interesse pela quantidade de pixels detectada nas respectivas bandas da proteína normalizadora (Klein, Deborah; Kern, Rita M; Sokol, Rebecca Z., 1995).

3.13 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para um nível de significância de, pelo menos, 5 % ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS

Conforme citamos, como nosso principal objetivo era acompanhar o comportamento do imunoconteúdo de HSP70 pós-sessão de terapia hipertérmica aguda e da produção de óxido nítrico, organizamos o protocolo experimental contemplando quatro grupos experimentais, que corresponderam ao momento da morte após o estresse térmico agudo. Tínhamos, então, o grupo de animais que fora morto 1 h pós-sessão aguda de terapia hipertérmica, bem como os de 2, 4 e 8 h.

Nestes grupos experimentais observamos a expressão das proteínas HSP70, HSF1, eNOS e nNOS no músculo esquelético com predominância de fibras oxidativas (sóleo) e glicolíticas (gastrocnêmio).

Também mensuramos a produção de nitritos e nitratos totais nos músculos gastrocnêmio e sóleo nestes diferentes momentos.

4.1 Conteúdo de NO_x^- total no músculo gastrocnêmio:

No que diz respeito a quantidade de NO produzido, que analisamos a partir da detecção colorimétrica de nitritos e nitratos totais (NO_x^-) no músculo gastrocnêmio, observamos diferença estatisticamente significativa entre o momento de uma hora e os valores basais. Sendo que esta diferença persistiu na avaliação do tempo de duas horas, conforme figura na sequência ($P < 0,05$). Os momentos 4 e 8 h não apresentaram diferença significativa (Figura 8).

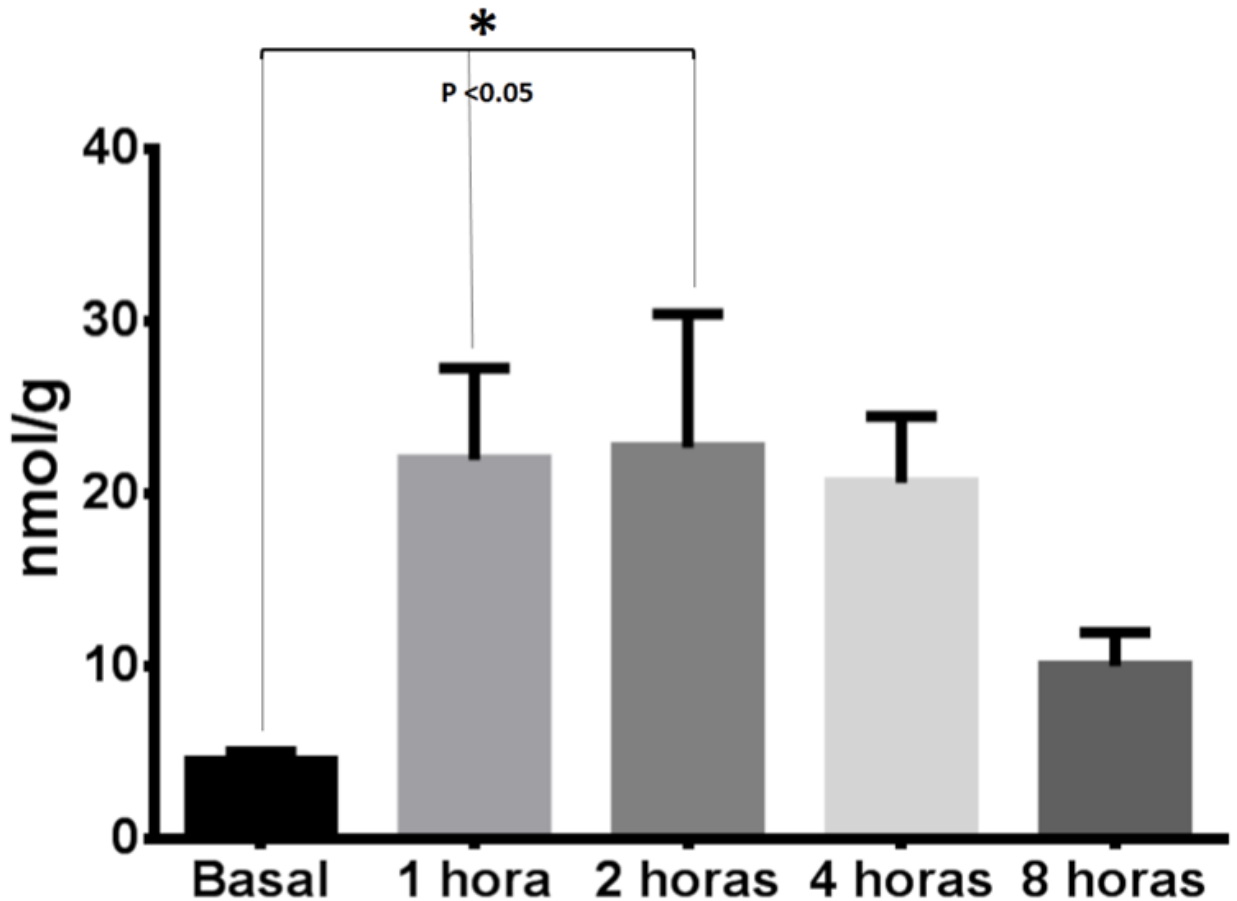


Figura 8. Conteúdo de NO_x⁻ total no músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos que foram mortos 1, 2, 4 e 8 horas pós-sessão de terapia hipertérmica. Diferenças entre as médias calculadas com base na análise de variância (ANOVA) de uma via. Dados expressos em média ± e.p.m. (P < 0,0001). n = 08 por grupo.

4.2 Conteúdo de NO_x⁻ total no músculo sóleo:

A análise nos músculos sóleos dos animais, apresentou resultado diferente do que havíamos encontrado nos gastrocnêmios. Nos sóleos, encontramos diferença, de modo similar ao que obtivemos nos gastrocnêmios, nos momentos uma e duas horas pós-tratamento térmico agudo quando comparamos com valores basais, mas também

houve diferença significativa entre o momento de 4 horas e os valores basais. Além disso, o momento de 8 horas foi diferente do momento 1 hora pós-sessão de terapia hipertérmica (Figura 9).

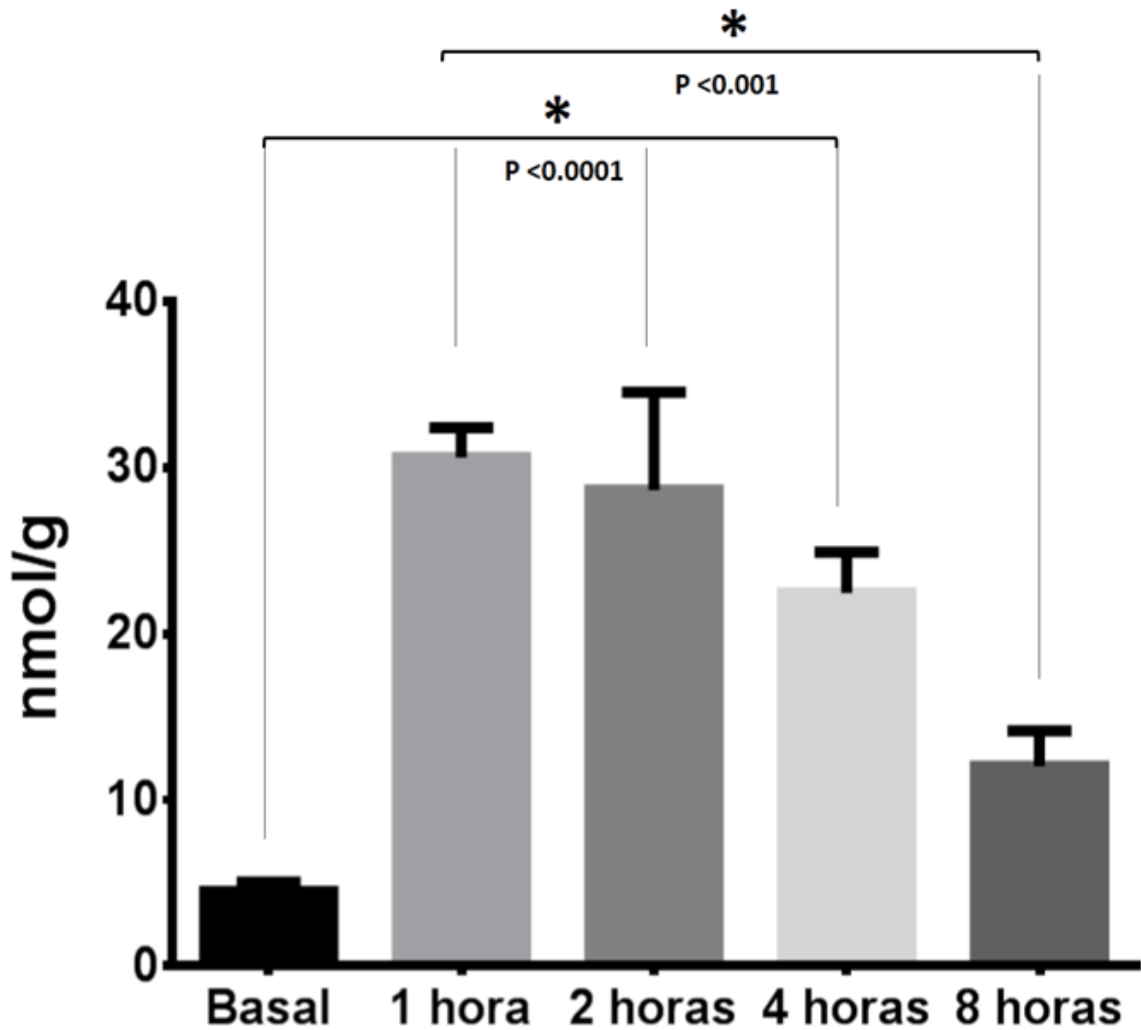


Figura 9. Conteúdo de NO_x total no músculo sóleo de ratos dos grupos que foram mortos 1, 2, 4 e 8 horas pós-sessão de terapia hipertérmica. Diferenças entre as médias calculadas com base na análise de variância (ANOVA) de uma via. Dados expressos em média ± e.p.m. (P < 0,0001). n = 08 por grupo.

4.3 Expressão de HSP70 no músculo gastrocnêmio:

Em relação à expressão de HSP70 no músculo esquelético observamos diferença significativa somente 8 horas pós-tratamento térmico agudo (Figura 10).

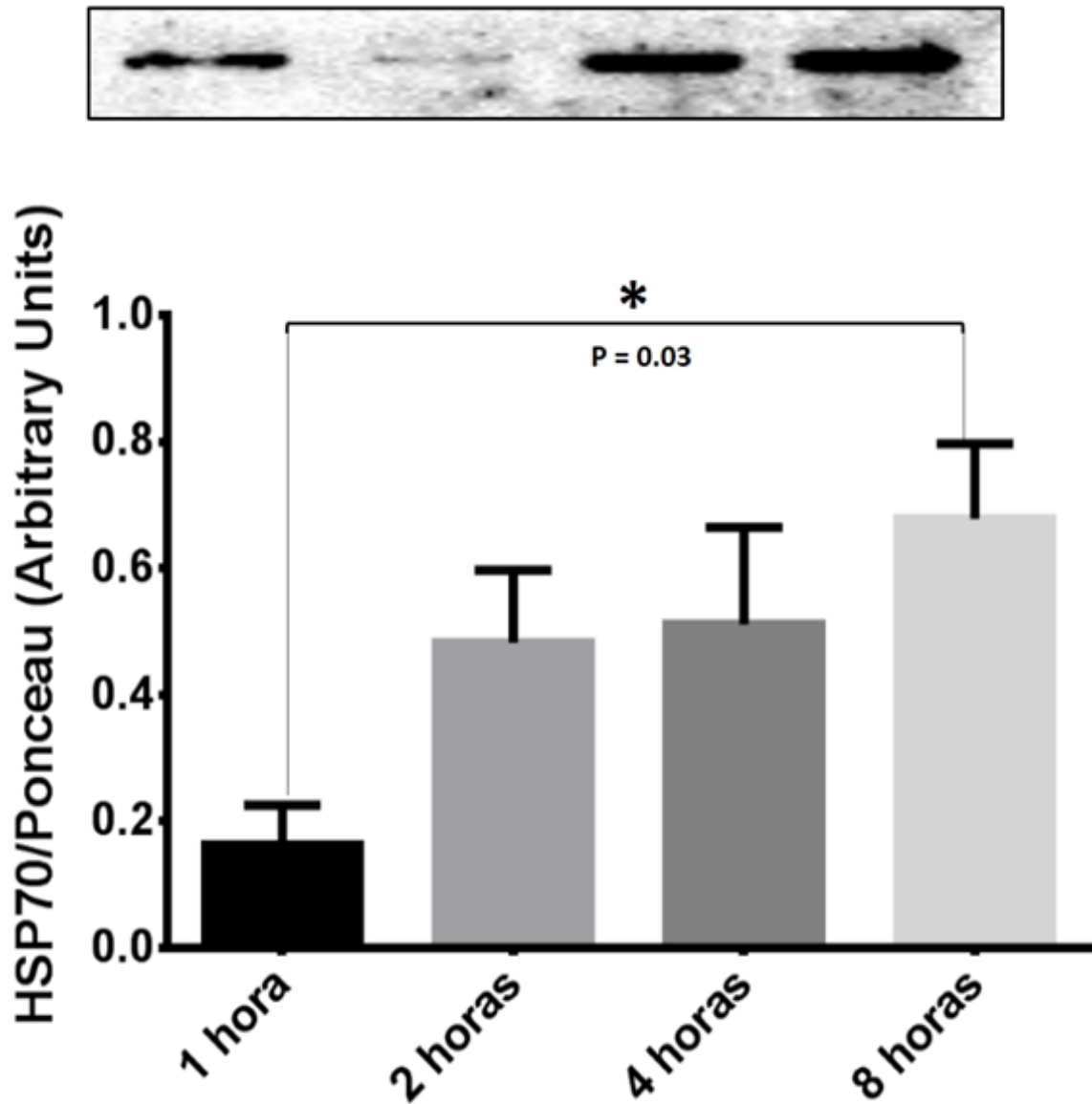


Figura 10. Imunodeteção de HSP70 no músculo gastrocnêmio de ratos 1, 2, 4 e 8 horas pós-sessão de terapia hipertérmica. Diferenças entre as médias calculadas com base na análise de variância (ANOVA) de uma via. Dados expressos em média \pm e.p.m. ($P < 0,05$). $n = 08$ por grupo.

4.4 Expressão de HSF1 no músculo gastrocnêmio:

Em relação à expressão de HSF1 no músculo esquelético observamos diferença significativa somente 8 horas pós-tratamento térmico agudo (Figura 11).

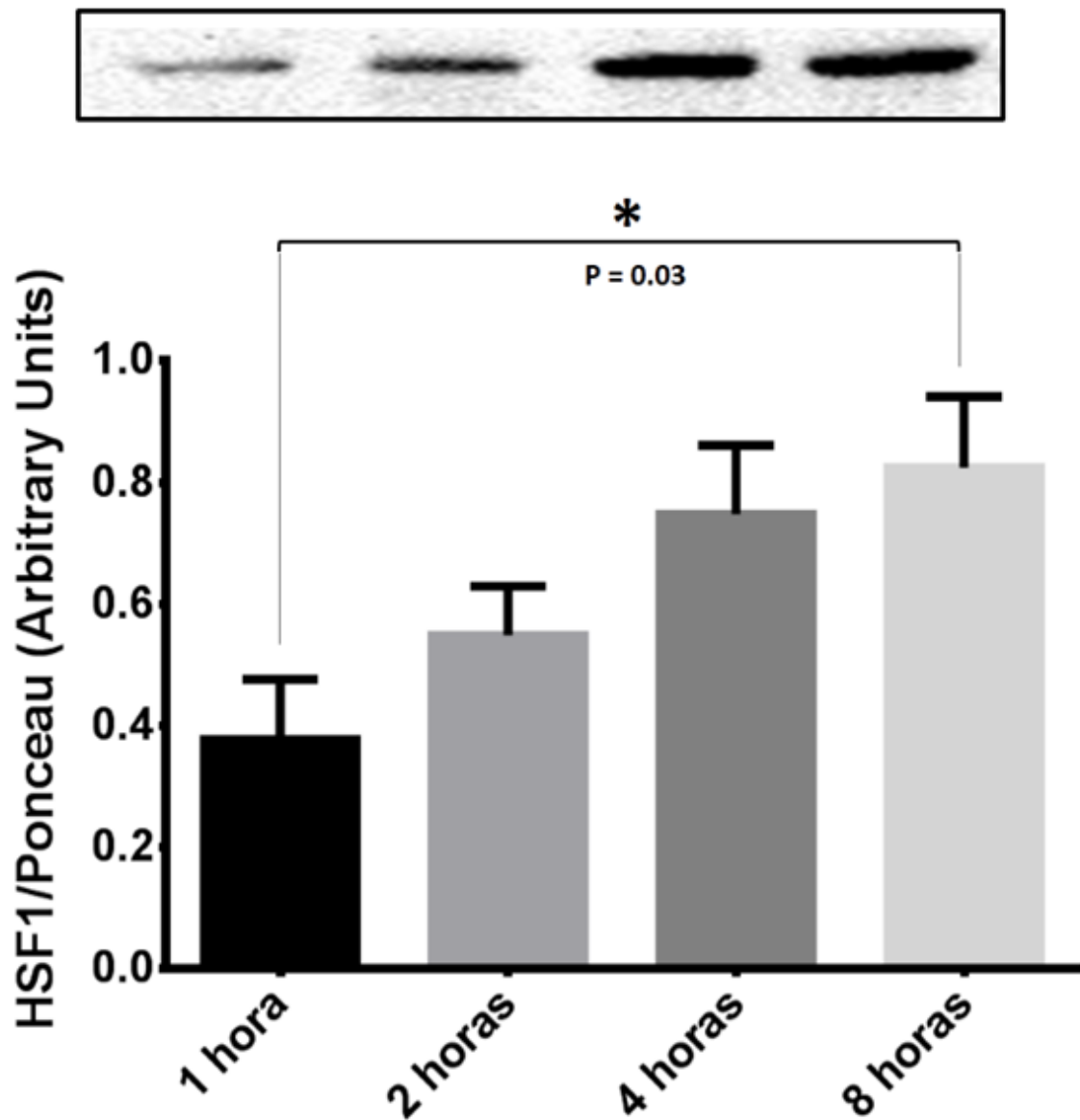


Figura 11. Imunodeteção de HSF1 no músculo gastrocnêmio de ratos 1, 2, 4 e 8 horas pós-sessão de terapia hipertérmica. Diferenças entre as médias calculadas com base na análise de variância (ANOVA) de uma via. Dados expressos em média \pm e.p.m. ($P < 0,05$). $n = 08$ por grupo.

4.5 Expressão de HSP70 no músculo sóleo:

Em relação à expressão de HSP70 no músculo esquelético com fibras predominantemente oxidativas, observamos diferença significativa 4 horas pós-tratamento térmico agudo (Figura 12).

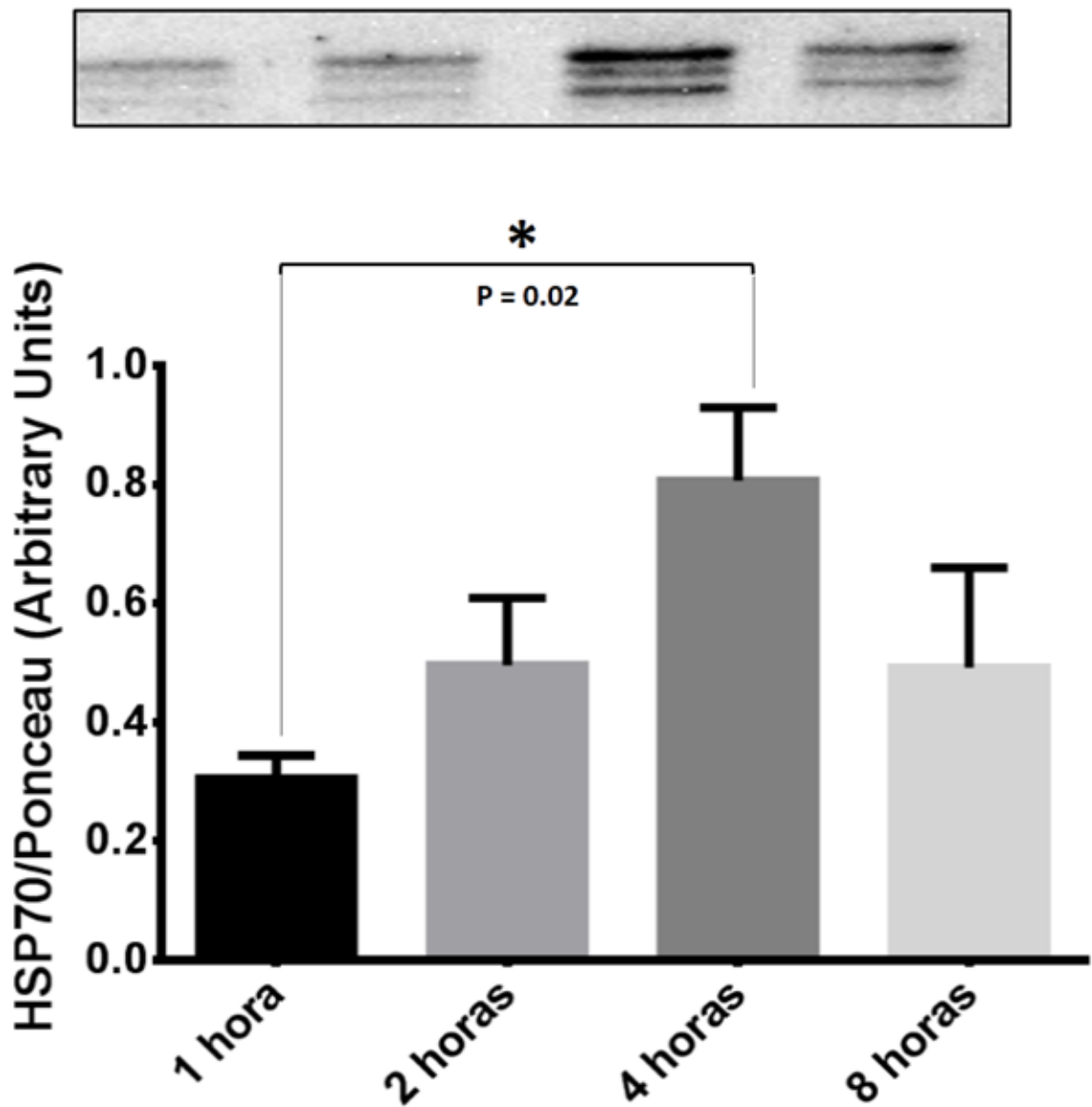


Figura 12. Imunodeteção de HSP70 no músculo sóleo de ratos 1, 2, 4 e 8 horas pós-sessão de terapia hipertérmica. Diferenças entre as médias calculadas com base na análise de variância (ANOVA) de uma via. Dados expressos em média \pm e.p.m. ($P < 0,05$). $n = 08$ por grupo.

4.6 Expressão de eNOS no músculo sóleo:

Não observamos diferença na isoforma endotelial da óxido nítrico sintase nos tempos analisados, conforme figura 13.

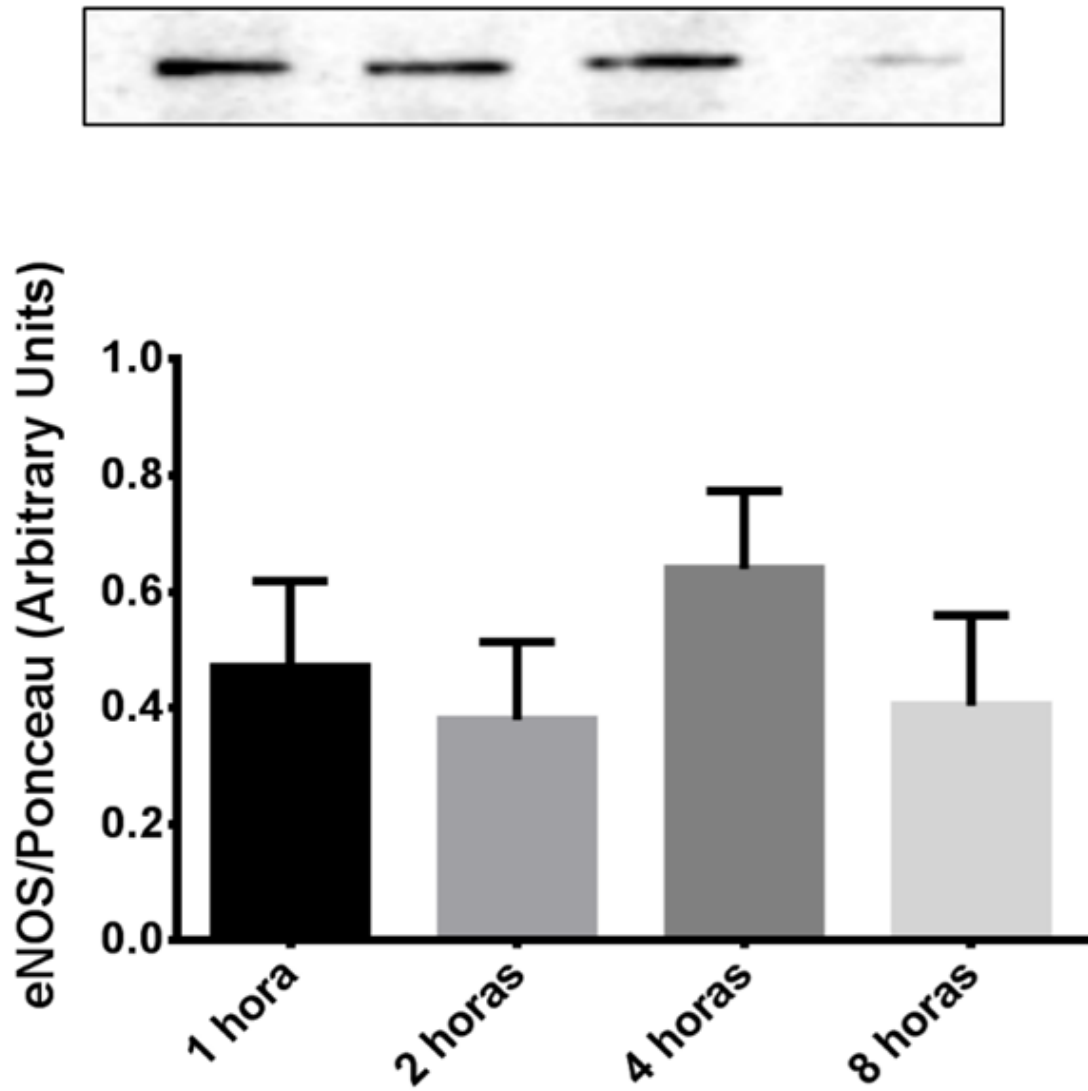


Figura 13. Imunodeteção de eNOS no músculo sóleo de ratos 1, 2, 4 e 8 horas pós-sessão de terapia hipertérmica. Diferenças entre as médias calculadas com base na análise de variância (ANOVA) de uma via. Dados expressos em média \pm e.p.m. ($P > 0,05$). $n = 08$ por grupo.

5 DISCUSSÃO

Nosso principal achado neste estudo foi mostrar que o aumento na expressão de HSP70 e na produção de óxido nítrico, em decorrência de uma sessão de terapia hipertérmica, se deu com diferenças temporais em músculos esqueléticos de ratos Wistar com diferentes perfis de fibras. Conforme visto, analisamos gastrocnêmios, que são predominantemente glicolíticos e sóleos, oxidativos.

Nos seres humanos, a terapia térmica induz rápidas mudanças no fluxo sanguíneo. Com o aumento da temperatura corporal, acontece uma vasodilatação periférica, aumentando o fluxo sanguíneo para esta região, tendo como objetivo a dissipação do calor e retomada da homeostasia térmica. Como dissemos, esta vasodilatação é devida, em parte, ao NO. O tratamento térmico acarreta um grande aumento no fluxo sanguíneo nos tecidos superficiais aquecidos do corpo o que leva ao aumento da tensão de cisalhamento na vasculatura do tecido da superfície, o que sabemos regula para cima a expressão e atividade da NO sintase endotelial, com consequente aumento da biodisponibilidade de NO por diversos mecanismos (Uematsu, Masaaki et al et al., 1995, Ranjan, Vibhu; Xiao, Zeshuai; Diamond, Scott., 1995, Woodman, Christopher R.; Price, Elmer M.; Laughlin, M. Harold, 2005). Além disso, o NO é um modulador essencial da captação de glicose, participa da ativação de várias enzimas relacionadas ao metabolismo oxidativo e, é claro, da vasomotricidade.

Foi demonstrado, também, que esse incremento no fluxo sanguíneo induz uma regulação positiva da biossíntese de tetraidrobiopterina (BH4). A tetraidrobiopterina é um cofator essencial para a produção de NO pela eNOS. O eNOS homodímero ligado a BH4 sintetiza NO convertendo L-arginina em L-citrulina na presença de O₂. Na ausência de L-arginina ou BH4, a eNOS desacoplada na forma de monômero e sintetiza superóxido em vez de NO. A base molecular do desacoplamento da eNOS é a conversão da NOS na forma de homodímero para a forma de monômero (Kruzliak, Peter; Maruyama, Junko; Maruyama, Kazuo, 2014).

No que diz respeito ao conteúdo de nitritos e nitratos totais (tNO_x⁻) nos gastrocnêmios, obtivemos valores com diferença significativa (P < 0,05) nos tempos de 1 hora e 2 horas após a sessão de terapia hipertérmica. Apesar do momento 4 horas também ter permanecido elevado, este não teve diferença significativa quando comparamos com os valores basais de referência.

Quando observamos as alterações na produção tNO_x^- nos sóleos, esta diferença se manteve por um período mais longo que nos gastrocnêmios, encontramos diferença também até 4 h após a terapia térmica aguda.

Malyshev, IYu, et al, 2000, mostraram um aumento imediato na produção de NO pós-choque térmico (espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica), que consistia em 15 min mantendo os animais (ratos Wistar) com uma temperatura central de 42 °C, no fígado, cérebro e coração.

Com humanos e utilizando um modelo de terapia térmica diferente do nosso (sauna finlandesa), Gryka, Dorota, et al, 2020 encontraram, após uma sessão aguda (consistia em três sessões de quinze minutos com intervalos de 2 min de recuperação), um aumento nas concentrações plasmáticas de nitritos e nitratos totais dez minutos pós-banho, sendo que esta diferença se manteve até 24 h depois da sauna num grupo de indivíduos treinados (cardiorrespiratório). Por sua vez, Hoekstra, Sven P., et al., 2018, utilizando um modelo de terapia hipertérmica por hot tub, submeteram homens com sobrepeso ao choque térmico durante uma hora, encontraram valores de nitrito plasmático significativamente maiores no momento imediato, entretanto, estes valores estavam normalizados duas horas depois. In vitro, Park, Jung-Hyun, et al, 2013, submeteram células endoteliais aórticas bovinas a 30 minutos de terapia térmica por infravermelho e mostraram um aumento na produção aguda de NO, medida pela produção de nitrito no sobrenadante destas células em cultura.

É possível que estes achados sejam, em parte, dependentes do tipo de fibra muscular. Alguns estudos têm mostrado uma maior resposta da terapia térmica em músculos com mais fibras do tipo I em detrimento as do tipo II na morfologia muscular. Por exemplo, Kim, Kyoungrae et al., 2019, num modelo de dano muscular induzido por isquemia, mostraram que uma sessão de terapia térmica provocou ativação de fatores miogênicos bem como reguladores positivos e negativos de massa muscular em sóleos, mas não nos extensores longos dos dedos. Também Hirunsai, Muthita, Ratchakrit Srikuea, e Yimlamai, Tossaporn, 2015, mostraram que a terapia térmica provocou alterações morfológicas no sóleo de animais após tenotomia, mas não no plantar.

Nossos achados corroboram estes estudos quando também mostramos o aumento na medida de nitritos e nitratos totais no homogenato de músculos

esqueléticos em decorrência da sessão aguda de tratamento hipertérmico, com as diferenças temporais já citadas entre sóleos e gastrocnêmios.

No que diz respeito à expressão de HSP70, nos pontos analisados, vimos que o pico de HSP72 deu-se 8 h pós-terapia hipertérmica em relação a 1 h após no caso dos gastrocnêmios. Nos sóleos esta diferença deu-se mais cedo: no ponto de 4 h após o tratamento houve o pico.

Medimos também, o fator de transcrição de proteínas do choque térmico (HSF1) nos gastrocnêmios. Durante estresse celular, o HSF1, como dissemos, é um fator transcricional chave de chaperonas, co-chaperonas e ubiquitinas, entre elas a HSP70 (Vihervaara, A. e Sistonen, L., 2014). Em acordo com o aumento encontrado na expressão de HSP70, mostramos também o aumento no HSF1 nestes tecidos.

Nossos resultados são similares, em parte aos de Chung, Jason, et al, 2008, que também no gastrocnêmio de ratos e mantendo-os durante 15 min a 41,5 °C (temperatura retal), analisou diferentes pontos após o choque térmico (imediate, 1, 4, 8 e 24 h) e encontrou diferenças apenas no momento 8 h. Há, no entanto, uma variabilidade nas respostas conforme mudam os modelos experimentais. Por exemplo, Silverstein, Marnie G., et al., 2015, com camundongos C57/BL6 velhos também avaliou o efeito do aquecimento passivo na resposta de choque térmico após uma sessão de tratamento, que consistia em permanecer de 20 a 30 min em uma caixa com uma lâmpada para aquecimento sobre ele ajustada para manter a temperatura da caixa a 41 ± 2 °C. Estes animais foram mortos 24, 48 e 72 h após o tratamento agudo e apesar dos valores de HSP70 nos gastrocnêmios analisados aumentarem o dobro em todos os pontos, só houve diferença significativa no grupo 72 h.

Em outro modelo animal (macacos da espécie *Chlorocebus pygerythrus*) Kavanagh, Kylie, et al., 2016, por meio de biópsia muscular no vasto lateral (fibras predominantemente glicolíticas), avaliaram a expressão de RNAm de HSP70 após estímulo hipertérmico que durou 30 minutos e elevou a temperatura corporal até 39 - 41 °C. O RNAm da HSP70 estava elevado no imediate, 1 e 4 horas, em relação ao basal.

No músculo esquelético de humanos, Kuhlenhoelter, Alisha M., et al., 2016, avaliaram a resposta transcricional imediata das HSPs, sob estímulo hipertérmico em indivíduos jovens. Estes, tinham sua temperatura central aumentada de $36,9 \pm 0,1$ °C até $37,4 \pm 0,1$ °C, e como resultado, aumentou a HSP72 codificada pelo gene

HSPA1B, 30 minutos após a sessão aguda de terapia térmica no músculo esquelético. Curiosamente, a expressão de HSP72 codificada pelo gene HSPA1A, apesar de aumentar pós-sessão de tratamento térmico, não mostrou diferença significativa. HSPA1A e HSPA1B são os genes mais estudados e que codificam as HSPs da família de 72 kDa (HSP72), sendo que as proteínas resultantes diferem apenas em dois aminoácidos e que se acredita serem proteínas totalmente intercambiáveis (Kampinga, Harm H., et al., 2009, Heck, Thiago Gomes, et al., 2012). Estes autores também fizeram as medidas no momento duas horas, sendo que não havia diferença significativa na expressão de HSP72.

Nossos resultados somam-se a estes, apresentando um comportamento temporal diferente na expressão das HSPs que, conforme dissemos, dependeu do perfil de fibras no músculo analisado. Já em 1991, Locke e outros (Locke, Marius; Noble, Earl G.; Atkinson, Burr G., 1991), haviam mostrado que os níveis de HSP72 pareciam estar relacionados positivamente com o percentual de fibras oxidativas no músculo de animais não estressados. Mais recentemente, Oishi, Yasuharu, et al., 2002, mostraram diferenças temporais na ativação dos músculos com perfis diferentes: em sóleos, os níveis de HSP72 aumentaram imediatamente, duas e quatro horas após o estímulo hipertérmico. Já a resposta nos plantares aconteceu mais tardiamente, a partir de 24 e até 60 horas depois do choque térmico os valores de HSP72 ainda estavam mais altos que o controle.

Corroboramos, neste estudo, que a terapia de calor é capaz de induzir a expressão de HSP72 em vários tecidos, tecido muscular esquelético, neste caso. Esta HSP72 vai acarretar em efeitos benéficos, por exemplo, prevenindo vários efeitos metabólicos induzidos pela obesidade em nível molecular, melhorando a tolerância à glicose, o transporte de glicose estimulado pela insulina e a sinalização de insulina e redução nas atividades JNK e IKK β em camundongos HFD (Krause, Mauricio, et al., 2015a). Animais HFD apresentam significativas reduções na fosforilação de eNOS, da AMPK e da expressão de sirtuína-1 (SIRT1), desregulando a produção de óxido nítrico e a vasodilatação normal (Krause, Mauricio, et al., 2015b). A submissão destes animais à terapia de calor (41 °C durante 20 minutos / 12 semanas), atenuou esses efeitos nas vias de sinalização. Confirmando esta via, a inibição da eNOS e SIRT1 impediu os benefícios da terapia de calor (Karpe, Pinakin Arun; Tikoo, Kulbhushan, 2014). Tais conclusões sugerem que a indução de HSP70 por terapia de calor aumenta a fosforilação e a expressão de AMPK e eNOS em estados de resistência à

insulina. Como resultado, mais óxido nítrico pode ser produzido, melhorando a vasomotricidade e a vasoproteção (Krause, Mauricio, et al., 2015b). Contudo, apesar dos diversos benefícios atribuídos a terapia de calor para pessoas obesas e diabéticas (Mauricio, et al., 2015a; Krause, Mauricio, et al., 2015b), o mecanismo exato pelo qual estes efeitos são mediados ainda não estão completamente esclarecidos. A maioria dos estudos foi feita com animais, num modelo que causa aumentos na temperatura corporal que não são atingíveis em humanos. Sendo assim, os efeitos da terapia térmica devem ser inicialmente induzidos por um mecanismo mais sensível (Krause, Mauricio et al., 2015a). É sabido que a HT acarreta rápidos efeitos cardiovasculares, entre eles uma vasodilatação periférica, no intuito de aumentar a dissipação de calor. O sistema nervoso simpático está envolvido nestas ações, cuja atividade está aumentada durante a terapia térmica e, um componente chave para esta vasodilatação parece ser o NO, uma vez que inibir as NOS, inibe este reflexo vasodilatador causado pelo choque térmico. Com efeito, este aumento se daria por intermédio de uma aumentada ativação da eNOS, (Hoekstra, Sven P., et al., 2018).

Com isso em mente medimos eNOS nas amostras analisadas, mas em nosso caso, não encontramos diferença na expressão desta como consequência da terapia.

Alguns estudos demonstraram que a expressão de HSP70, que aparentemente é a principal modificação no hot tub, depende muito da produção prévia de óxido nítrico (Malyshev, IYu, et al., 2000). A inibição prévia da NOS, antes do choque térmico, em ratos, mostrou limitar a resposta vasodilatadora frente ao aquecimento corporal. A administração de inibidores inespecíficos de NOS via microdiálise ou via infusão, pela artéria braquial, limitou não só a resposta vasodilatadora reflexa ao aquecimento corporal, mas também reduziu a síntese de HSP70 induzida por terapia de calor, sugerindo que o óxido nítrico está envolvido nessa indução (Malyshev, IYu, et al., 2000). O efeito anti-hipotensivo da adaptação ao calor demonstra claramente o cross-talk entre o óxido nítrico e HSP70 (Malyshev, IYu, et al., 2000).

Com isso, nosso grupo propôs que o aumento no NO, em decorrência do estímulo do sistema nervoso simpático após o aumento na temperatura corporal vai causar, a posteriori, um aumento nas proteínas de choque térmico, que por sua vez aumenta os níveis de eNOS fosforilada, aumentando os níveis de NO, o que melhorará a vasomotricidade e vasoproteção.

Todos estes resultados sugerem que as adaptações no músculo esquelético, no que diz respeito à produção de NO e HSP72 sejam multifatoriais. Variáveis como

protocolo de aquecimento, tecido ou mesmo perfil de fibras do músculo analisado, podem influenciar a resposta final. Em nosso modelo mostramos que o pico de liberação de HSP72 em decorrência do tratamento térmico e consequente liberação de NO se deu em diferentes momentos nos músculos analisados. Obviamente, são necessários mais estudos para demonstrar a relação causal entre NO e proteínas de estresse térmico.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nosso estudo mostrou que houve diferenças temporais conforme o músculo analisado na expressão de HSP72 e produção de óxido nítrico em ratos Wistar e que o estímulo de uma sessão de terapia hipertérmica foi suficiente para aumentá-los.

Nosso projeto inicial visava medidas das isoformas neuronal e endotelial das sintases do óxido nítrico em ambos músculos analisados, além do HSF1, o que não foi possível realizar. Planejamos agora, analisar outros tecidos (fígado, tecido adiposo e encéfalo), repetir as proteínas não reveladas e também, utilizando éster metílico de L-nitroarginina (L-NAME), inibir a ação das NO sintases, impedindo a elevação do óxido nítrico nos momentos apropriados e repetir as análises nas HSPs com o bloqueio.

REFERÊNCIAS

Albus, Udo. "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edn)." (2012): 267-268.

Anckar, Julius, and Lea Sistonen. "Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease." *Annual review of biochemistry* 80 (2011): 1089-1115.

Andersen, Monica Levy, et al. *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*. Departamento de Psicobiologia. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo, 2004.

Asea, Alexzander AA, and Punit Kaur, eds. *Regulation of heat shock protein responses*. Vol. 13. Springer, 2018

Asea, Alexzander, et al. "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70 role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." *Journal of Biological Chemistry* 277.17 (2002): 15028-15034.

Brown, Eric T., et al. "Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice." *Visual neuroscience* 22.5 (2005): 615-618.

Bruxel, Maciel Alencar, et al. "Chronic whole-body heat treatment relieves atherosclerotic lesions, cardiovascular and metabolic abnormalities, and enhances survival time restoring the anti-inflammatory and anti-senescent heat shock response in mice." *Biochimie* 156 (2019): 33-46.

Chung, Jason, et al. "HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.5 (2008): 1739-1744.

Elia, Guiliano; Santoro, Maria. "Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells." *Biochemical journal* 300.1 (1994): 201-209.

Farah, Charlotte, Lauriane YM Michel, and Jean-Luc Balligand. "Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease." *Nature Reviews Cardiology* 15.5 (2018): 292.

Furman, David, et al. "Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span." *Nature medicine* 25.12 (2019): 1822-1832.

García-Robledo, Emilio, Alfonso Corzo, and Sokratis Papaspyrou. "A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes." *Marine Chemistry* 162 (2014): 30-36.

GOLDIM, José Roberto, and Márcia Mocellin Raymundo. "Pesquisa em saúde e direito dos animais. 1999." (2003).

Gomez-Pastor, Rocio, Eileen T. Burchfiel, and Dennis J. Thiele. "Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19.1 (2018): 4.

Grisham, Matthew B.; Johnson, Glenda G.; Lancaster Jr., Jack R. "Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids." *Methods in enzymology*. Vol. 268. Academic Press, 1996. 237-246.

Gryka, Dorota, et al. "The influence of Finnish sauna treatments on the concentrations of nitric oxide, 3-nitrotyrosine and selected markers of oxidative status in training and non-training men." *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 33.2 (2020): 1-13.

Harkins, Michelle S. "Exercise regulates heat shock proteins and nitric oxide." *Exercise and sport sciences reviews* 37.2 (2009): 73-77.

Heck, Thiago Gomes, et al. "Role of heat shock proteins in skeletal muscle." *Skeletal Muscle-From Myogenesis to Clinical Relations*. IntechOpen, 2012.

Hirunsai, Muthita, Ratchakrit Srikuea; Yimlamai, Tossaporn. "Heat stress promotes extracellular matrix remodelling via TGF- β 1 and MMP-2/TIMP-2 modulation in tenotomised soleus and plantaris muscles." *International Journal of Hyperthermia* 31.4 (2015): 336-348.

Hoekstra, Sven P., et al. "Acute and chronic effects of hot water immersion on inflammation and metabolism in sedentary, overweight adults." *Journal of Applied Physiology* 125.12 (2018): 2008-2018.

Hoff, Christina. "Immoral and moral uses of animals." (1980): 115-118.

Hooper, Philip L. "Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus." *New England Journal of Medicine* 341.12 (1999): 924-925.

Hooper, Philip L., et al. "The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes." *Cell Stress and Chaperones* 19.4 (2014): 447-464.

Hotamisligil, Gökhan S. "Inflammation and metabolic disorders." *Nature* 444.7121 (2006): 860-867.

Kampinga, Harm H., et al. "Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins." *Cell Stress and Chaperones* 14.1 (2009): 105-111.

Karpe, Pinakin A.; Tikoo, Kulbhushan. "Heat shock prevents insulin resistance–induced vascular complications by augmenting angiotensin-(1-7) signaling." *Diabetes* 63.3 (2014): 1124-1139.

Kavanagh, Kylie, et al. "Effects of heated hydrotherapy on muscle HSP70 and glucose metabolism in old and young vervet monkeys." *Cell Stress and Chaperones* 21.4 (2016): 717-725.

Kim, Kyoungrae, et al. "Heat therapy improves soleus muscle force in a model of ischemia-induced muscle damage." *Journal of Applied Physiology* 127.1 (2019): 215-228.

Klein, Deborah; Kern, Rita M; Sokol, Rebecca Z. "A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes." *Biochemistry and molecular biology international* 36.1 (1995): 59-66.

Kolberg, Angela, et al. "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 Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease* 24.1 (2006): 23-39.

Krause, Maurício S., 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 biochemistry and function* 25.1 (2007): 23-32.

Krause, Mauricio; Rodrigues-Krause, Josianne da Costa. "Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: possible targets outside the immune system and their role for neurodegenerative disorders treatment." *Medical hypotheses* 76.2 (2011): 286-290.

Krause, Mauricio, et al. "Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons." *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 18.4 (2015a): 374-380.

Krause, Mauricio, et al. "The chaperone balance hypothesis: the importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management." *Mediators of inflammation* 2015 (2015b).

Kregel, Kevin C. "Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance." *Journal of applied physiology* 92.5 (2002): 2177-2186.

Kruzliak, Peter; Maruyama, Junko; Maruyama, Kazuo. "Role of nitric oxide in pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension." *Vitamins & Hormones*. Vol. 96. Academic Press, 2014. 407-424.

Kuhlenhoelter, Alisha M., et al. "Heat therapy promotes the expression of angiogenic regulators in human skeletal muscle." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 311.2 (2016): R377-R391.

Locke, Marius; Noble, Earl G.; Atkinson, Burr G. "Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 261.5 (1991): C774-C779.

Malyshev, IYu, et al. "Antihypotensive Effect of Adaptation to Heat." *Physiol. Res* 49 (2000): 99-105.

Medzhitov, Ruslan. "Inflammation 2010: new adventures of an old flame." *Cell* 140.6 (2010): 771-776.

Mehta, Tapan A., et al. "Heat shock proteins in vascular disease—a review." *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 29.4 (2005): 395-402.

Miragem, Antônio Azambuja; Bittencourt, Paulo Ivo Homem de. "Nitric oxide-heat shock protein axis in menopausal hot flushes: neglected metabolic issues of chronic inflammatory diseases associated with deranged heat shock response." *Human reproduction update* 23.5 (2017): 600-628.

Muller, Carlos H. de L., et al. "Exercise Training for the Elderly: Inflammaging and the Central Role for HSP70." *Journal of Science in Sport and Exercise* (2019): 1-19.

Nakai, Akira, ed. *Heat shock factor*. Tokyo, Japan:: Springer, 2016.

Nathan, Carl; Ding, Aihao. "Nonresolving inflammation." *Cell* 140.6 (2010): 871-882.

Netea, Mihai G., et al. "A guiding map for inflammation." *Nature immunology* 18.8 (2017): 826.

Newsholme, Philip; Krause, Mauricio Krause. "Diet, obesity, and reactive oxygen species—implications for diabetes and aging." *Systems biology of free radicals and antioxidants* (2014): 3361-3374.

Newsholme, Philip, Bittencourt Jr, Paulo I. Homem de. "The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease." *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 17.4 (2014): 295-305.

Newsholme, Philip, et al. "Exercise and possible molecular mechanisms of protection from vascular disease and diabetes: the central role of ROS and nitric oxide." *Clinical Science* 118.5 (2010): 341-349.

Oishi, Yasuharu, et al. "Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature." *Journal of Applied Physiology* 92.3 (2002): 1097-1103.

Palmer, Allyson K., et al. "Cellular senescence in type 2 diabetes: a therapeutic opportunity." *Diabetes* 64.7 (2015): 2289-2298.

Park, Jung-Hyun, et al. "Far-infrared radiation acutely increases nitric oxide production by increasing Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine 1179." *Biochemical and biophysical research communications* 436.4 (2013): 601-606.

Ranjan, Vibhu; Xiao, Zeshuai; Diamond, Scott. "Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 269.2 (1995): H550-H555.

Saha, Joy K., et al. "Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models." *Experimental Biology and Medicine* 230.10 (2005): 777-784.

Schafer, Marissa J., et al. "Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease." *Nature communications* 8.1 (2017): 1-11.

Schett, Georg; Neurath, Markus F. "Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts." *Nature communications* 9.1 (2018): 1-8.

Silverstein, Marnie G., et al. "Inducing muscle heat shock protein 70 improves insulin sensitivity and muscular performance in aged mice." *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences* 70.7 (2015): 800-808.

Singh, Ishwar S.; Hasday, Jeffrey D. "Fever, hyperthermia and the heat shock response." *International Journal of Hyperthermia* 29.5 (2013): 423-435.

Smith, Paul K. et al. "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Analytical biochemistry* 150.1 (1985): 76-85.

Tilg, Herbert, et al. "The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation." *Nature Reviews Immunology* (2019): 1-15.

Uematsu, Masaaki et al. "Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 269.6 (1995): C1371-C1378.

Woodman, Christopher R.; Price, Elmer M.; Laughlin, M. Harold. "Shear stress induces eNOS mRNA expression and improves endothelium-dependent dilation in senescent soleus muscle feed arteries." *Journal of applied physiology* 98.3 (2005): 940-946.

Woods, Jeffrey A., Vieira, Victoria J.; Keylock, K. Todd. "Exercise, inflammation, and innate immunity." *Immunology and allergy clinics of North America* 29.2 (2009): 381-393.